

Testung einer aktiven Tau-Immunisierung zur Verminderung der Motoneuronendegeneration im Tau-transgenen Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

an der medizinischen Universität Leipzig

eingereicht von Marie-Catherine Schaller

geboren am 09.01.1987 in Naumburg

am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung

Betreuer: PD Dr. Max Holzer

Beschluss über die Verleihung des

Doktorgrades vom 17.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Bibliografische Beschreibung	5
1 Einleitung	9
1. 1 Neurodegeneration	9
1. 2 Die Alzheimersche Erkrankung	9
1. 2. 1 Symptomatik	10
1. 2. 2 Diagnostik	11
1. 2. 3 Epidemiologie	12
1. 2. 4 Pathologie der AD auf Zellebene	12
1. 2. 5 Amyloid- β	13
1. 2. 6 Preseniline	15
1. 2. 7 Tau	16
1. 2. 8 Amyloid-Hypothese und <i>Dual Pathway</i>	18
1. 2. 9 Apolipoprotein E und Glykogen-Synthasekinase 3	19
1. 2. 10 Retromer und wnt-Signalweg	20
1. 2. 11 Tau-Oligomere als Ursache der Neurodegeneration	21
1. 2. 12 Andere Entstehungstheorien der AD	22
1. 3 Aktuelle Therapieansätze der Tau-Pathologie	23
1. 3. 1 Immunisierung als therapeutischer Ansatz	24
1. 3. 2 A β als Zielstruktur der Immunisierung	25
1. 3. 3 Tau als Zielstruktur der Immunisierung	27
2 Aufgabenstellung	30
3 Methoden und Materialien	31
3. 1 Studiendesign	31
3. 2 Versuchstiere	31

3. 3 Prozess der Immunisierung	34
3. 4 Rotarod	38
3. 5 Quantifizierung der alpha-Motoneurone	40
3. 6 Verhaltensbeobachtungen während der Tests	43
3. 7 Gewicht	45
3. 8 Statistische Analyse	46
4 Ergebnisse	47
4. 1 Rotarod	47
4. 2 Analyse des Tau-Antikörpertiters	51
4. 3 Quantifizierung der alpha-Motoneurone	51
5 Diskussion	57
6 Zusammenfassung	67
7 Literaturverzeichnis	71
8 Selbstständigkeitserklärung	91
9 Lebenslauf	92
10 Danksagung	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Histologische Darstellung von β -Amyloid als pathologisches Kennzeichen der AD (Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung)	13
Abbildung 1.2 Histologische Darstellung von Neurofibrillären Tangles (NFT) als pathologische Kennzeichen der AD (Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung) ...	13
Abbildung 1.3 Prozessierung des <i>Amyloid-Precursor-Proteins</i>	14
Abbildung 1.4 Pathologische Veränderung der Nervenzellen bei Tauopathie	17
Abbildung 3.1 Zeitstrahl zum Versuchsverlauf	34
Abbildung 3.2 Pseudophosphorylierung des Tauproteins	36
Abbildung 3.3 Darstellung von Tau und den in dieser Studie verwendeten Tau-Fragmenten und deren pseudophosphorylierten Aminosäuren.....	37
Abbildung 3.4 Darstellung des Rotarod-Apparats	39
Abbildung 3.5 Darstellung des Rückenmarksschnitts eines Versuchstieres.....	42
Abbildung 3.6 Darstellung der Meßregion (250 x 250 μ m) im Vorderhorn des Rückenmarks der Versuchstiere, in welchem der Durchmesser aller α -Motoneurone größer als 10 μ m markiert wurde.....	43
Abbildung 3.7 Darstellung eines α -Motoneurons im Vorderhorn des Rückenmarks eines Versuchstieres	43
Abbildung 3.8 pathologischer Reflex der Hinterbeine bei der P301L-Mutation.....	45
Abbildung 4.1 Ergebnisse des Rotarod-Tests in allen 3 Gruppen vor und nach der Immunisierung.....	48
Abbildung 4.2 Quantifizierung der α -Motoneurone in allen 3 Gruppen.....	54
Abbildung 4.3 Korrelation (r) der Anzahl der α -Motoneurone pro 250 μ m x 250 μ m und der Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat nach dem Zeitpunkt der Immunisierung.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Darstellung einiger bisher erprobter Wirkstoffe in der Behandlung der AD (Salomone et al. 2012)	24
Tabelle 3.1 Darstellung aller Versuchstiere mit Alter zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung, sowie Zuordnung zur entsprechenden Versuchsgruppe	33
Tabelle 3.2 Bestandteile der verschiedenen Injektionsgemische entsprechend der drei Versuchsgruppen.....	35
Tabelle 4.1 Rankingtabelle der gemittelten Verweilzeit auf dem Rotarod aller einzelnen Versuchstiere in allen vier Trials nach Immunisierung	50
Tabelle 4.2 Antikörpertiter gegen das Tau-Protein nach Tötung der Versuchstiere ...	51
Tabelle 4.3 Ergebnisse der Quantifizierung der α -Motoneurone im Rückenmark der Tiere durch zwei unabhängige Zählende	53

Bibliografische Beschreibung

Schaller, Marie-Catherine

Testung einer aktiven Tau-Immunisierung zur Verminderung der Motoneuronendegeneration im Tau-transgenen Mausmodell

Universität Leipzig, Dissertation

94 S. , 174 Lit., 15 Abb., 6 Tab., 3 Anlagen

Referat:

Die Alzheimer-Krankheit (AD) ist ein, durch Neurodegeneration verursachtes Demenz-Syndrom. Hauptmerkmal der AD sind histologische Veränderungen der Hirnrinde: die senilen Plaques und die neurofibrillären Tangles (NFT). Letztere entstehen aus fehlgefalteten, aggregierten Tau-Proteinen, die Neurone in ihrer Funktion beeinträchtigen und zur Neurodegeneration führen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung der motorischen Leistungsfähigkeit von Tau-transgenen Mäusen nach aktiver Immunisierung mit pseudophosphoryliertem Tau-Antigen als potentiell therapeutische Intervention zur Inhibierung der Tau-Protein-Aggregation als mögliche Ursache der Motoneurondegeneration.

Hierzu wurden weibliche Mäuse, die transgen für das Tau-Protein mit der Prolin-301-Leucin-Mutation (P301L) sind, verwendet, die zu einer zeitigen Tau-Aggregation mit NFT-Bildung und einer frühen Neurodegeneration führt. Es wurden drei unterschiedliche Gruppen untersucht: Eine Tau-immunisierte Gruppe, eine Mock-immunisierte Gruppe und eine unbehandelte Kontrollgruppe. Ein neuer Ansatz dieser Studie ist die Immunisierung mittels pseudophosphorylierter Tau-Protein-Fragmente, mit welcher die Tau-Gruppe behandelt wurde. Deren Ergebnisse wurden mit denen der Mock-Gruppe, welche eine unspezifische

Aktivierung des Immunsystems mittels kompletten Freundschens Adjuvans erhielt, und einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Um motorische und morphometrische Veränderungen innerhalb der Gruppen aufzudecken und zu analysieren wurden Rotarod-Tests, sowie eine Quantifizierung von α -Motoneuronen in den Vorderhörnern des Rückenmarks der Tiere vorgenommen. Ebenso wurde der Tau-Antikörper-Titer gemessen.

Es zeigte sich, dass die Versuchstiere, die eine Tau-Immunisierung mittels Tau-Protein-Fragmenten erhielten, motorische Defizite im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, v. a. zur Kontrollgruppe, weniger stark ausprägten. Die Tiere der Tau-immunisierten Gruppe konnten signifikant länger auf dem Rotarod verweilen und zeigten eine signifikant verringerte Neurodegeneration der α -Motoneurone in den Vorderhörnern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein ähnlicher, jedoch nicht signifikanter Trend, zeigt sich auch in den Tieren, die eine unspezifische Immunisierung erhielten (Mock-Gruppe). Auch sie wiesen längere Verweilzeiten auf dem Rotarod-Apparat auf und eine geringere Neurodegeneration in den Vorderhörnern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine spezifische Tau-Immunisierung war jedoch weitaus effektiver.

Abkürzungsverzeichnis

A β	beta Amyloid
Ach	Acetylcholin
ApoE	Apolipoprotein E
API	Alzheimer's Prevention Initiative
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β -site-Amyloid-Precursor-Protein-cleaving-enzyme
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CFA	komplettes Freund's Adjuvans
CSF	Kolonie stimulierende Faktoren
EOAD	early onset Alzheimer's disease
FAD	familial Alzheimer's disease
FTDP-17	frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosom 17
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 beta
ICFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
IVIG	intravenöses Immunglobulin
K	Kontrollgruppe
L1/2	Lumbalwirbel 1/2
LOAD	late onset Alzheimer's disease
M	Mock-Gruppe
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
MMSE	mini mental state examination
mtDNA	mitochondriale DNA
NFT	neurofibrilläre Tangles
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug

PG	Prüfgröße
P301L	Prolin-301-Leucin-Mutation des Tau-Proteins
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
rpm	rounds per minute
T	Tau-immunisierte Gruppe
Th11	Thorakalwirbel 11
TOMA	Anti-Tau-Oligomer-spezifischer Antikörper
TRIM21	Tripartite motif containing protein 21

1 Einleitung

1. 1 Neurodegeneration

Neurone sind spezialisierte Zellen, die zusammen mit den Gliazellen die strukturelle und funktionelle Grundeinheit des Nervensystems bilden. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Informationen zu empfangen, zu verarbeiten und ggf. fortzuleiten. Dies geschieht unmittelbar elektrisch, oder häufiger chemisch, mit Hilfe von Botenstoffen, den sogenannten Neurotransmittern. Nervenzellen stehen in Kontakt zu anderen Nervenzellen, zu Muskelzellen (neuromuskuläre Endplatte) oder zu Drüsenzellen.

Neurodegeneration ist ein Überbegriff für eine Reihe von pathologischen Prozessen, die in erster Linie mit einem fortschreitenden Funktionsverlust von Neuronen und in Folge dessen mit einem vermehrten Untergang dieser im menschlichen Gehirn oder Rückenmark einhergehen. Wenn Neurone geschädigt werden oder vermehrt absterben, können sie nicht ersetzt oder reproduziert werden. Demzufolge sind auch Erregungsbildung und -leitung gestört, so dass es zu motorischen Funktionsstörungen (Ataxien, Paresen) und/oder kognitiven Leistungsdefiziten (Demenz) kommt. Beispiele für neurodegenerative Erkrankungen sind Multi-System-Atrophie, Chorea Huntington und die Parkinson- und Alzheimersche Erkrankung (AD: *Alzheimer's disease*). Neurodegenerative Erkrankungen sind meist nicht heilbar und führen zu einem zunehmendem Funktionsverlust motorischer und/oder kognitiver Prozesse (Mitchell 2014).

1. 2 Die Alzheimersche Erkrankung

Die AD wurde das erste Mal von Alois Alzheimer 1907 beschrieben, als eine Krankheit des präsenilen Alters, die sich v. a. in fortschreitender Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit äußert (Alzheimer 1907). Er schilderte auch erste histologische Veränderungen in der Hirnrinde, die heute bekannt sind als senile Plaques und neurofibrilläre Tangles.

Die AD ist ein Demenz-Syndrom. Demenz-Syndrome äußern sich in fortschreitenden kortikalen und subkortikalen Atrophien des Hirnparenchyms, woraus wiederum ein progredienter Verlust kognitiver Fähigkeiten resultiert (Masuhr und Neumann 2007). Es gibt unterschiedliche Arten von Demenzen, im Wesentlichen werden aber zwei Hauptformen unterschieden: die degenerative und die vaskuläre Demenz. Zu den degenerativen Demenzen, bei denen primär die Neurodegeneration für den pathologischen Mechanismus verantwortlich ist, zählt die AD, die Frontotemporale

Demenz und die Lewy-Körperchen-Demenz. Bei den vaskulären Demenzen kommt es aufgrund von Mikro- oder Makroangiopathien zur Krankheitsentstehung. Es gibt auch sekundäre Demenzen. Hierbei bedingt eine andere organische Erkrankung den geistigen Verfall. Diese können metabolisch, toxisch, infektiös oder durch Raumforderungen bedingt sein. Kognitive Störungen können aber auch im Rahmen von Depressionen auftreten und so als Demenz verkannt werden (sog. depressive Pseudodemenz) (Masuhr und Neumann 2007).

Die AD tritt allgemein zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr auf (Jellinger KA 2005). Man kann sie in eine sogenannte *late onset Alzheimer's disease* (LOAD), die nach dem 65. Lebensjahr auftritt und in eine *early onset Alzheimer's disease* (EOAD), die vor dem 65. Lebensjahr auftritt, unterteilen (Szigeti und Doody 2011; Jellinger KA 2005). 90% aller EOAD treten ebenso wie die LOAD sporadisch auf. Bei nur 10% ist eine genetische Ursache auszumachen (Chauhan und Chauhan 2006) und werden unter dem Begriff *Familial Alzheimer's Disease* (FAD) zusammengefasst. Bisher sind drei, für die Vererbung verantwortliche Gene bekannt (APP, PS1 und PS2 – s. Kapitel 1.2.5 und 6). Für die Krankheitsentstehung der LOAD scheint das Vorhandensein bestimmter ApoE-Varianten von Bedeutung zu sein (s. Kapitel 1.2.9).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich LOAD und EOAD auch bilddiagnostisch, pathologisch und biochemisch unterscheiden (Szigeti und Doody 2011). Für die EOAD sind v. a. Verluste des Sprachvermögens oder eine Apraxie typisch (Koedam et al. 2010), bei rasch progredientem Krankheitsverlauf (Jacobs et al. 1994). Histologisch zeigen sich bei der EOAD eher Verluste an Hirnsubstanz im occipitalen und parietalen Lappen (Frisoni et al. 2007). Bestimmte, für die AD typische Marker (Amyloid- β) können im Liquor der Erkrankten nachgewiesen werden. Diese sind im Schnitt niedriger bei EOAD-Erkrankten als bei LOAD-Erkrankten (Andreasen et al. 1999). Bei der LOAD steht der Gedächtnisverlust im Vordergrund (Koedam et al. 2010). Der Krankheitsverlauf ist langsamer (Jacobs et al. 1994). Histologisch treten Atrophien eher im Hippocampus auf (Frisoni et al. 2007) und der Amyloid- β -Gehalt im Liquor ist höher als der von EOAD-Betroffenen (Andreasen et al. 1999).

1. 2. 1 Symptomatik

Gekennzeichnet ist die AD v. a. durch langsam progrediente Gedächtnis-, Aufmerksamkeits- und Orientierungsstörungen (Masuhr und Neumann 2007). Dies

äußert sich v. a. im Kurzzeitgedächtnis: Kurz zuvor erlebte Geschehnisse werden nach kürzester Zeit aus dem Gedächtnis getilgt. Im weiteren Verlauf weitete sich dieser Zustand auch auf das biographische Gedächtnis aus. Hierbei ist ein retrograd fortschreitender Gedächtnisverlust zu verzeichnen, d. h. umso weiter ein Ereignis zurückliegt, umso später wird es eliminiert. Zusätzlich können im Verlauf auch neuropsychologische Ausfälle, Reflexdifferenzen und diskrete Parkinson-Symptome auftreten (Bennett 2000). Die Vigilanz bleibt intakt. Es kommt aber häufig mit Fortschreiten der Erkrankung zu depressiven Verstimmungen und gravierenden Beeinträchtigungen des Alltagslebens (Masuhr und Neumann 2007). Häufig beschleunigt eine Depression den Krankheitsverlauf noch zusätzlich (Bennett 2000). Die intellektuellen Fähigkeiten lassen nach, die Persönlichkeit bleibt aber lange erhalten. Mit Fortschreiten der generalisierten Hirnatrophie kommt es zu Störungen der emotionalen Kontrolle, der Motivation und des Sozialverhaltens (Masuhr und Neumann 2007). Die Kommunikation reduziert sich zunehmend: Worte entfallen, Paraphrasieren tritt auf. Das Sprachvermögen verschlechtert sich bis hin zur Aphasie. Zuletzt wird auch das motorische System befallen. Harn- und Stuhlinkontinenz sind die Folge. Der/die Betroffene wird pflegebedürftig (Masuhr und Neumann 2007). Zu den prognostisch bedeutsamen Parametern der AD gehören kognitiver Abbau, Hospitalisierung und Mortalität (Bennett 2000). Für gewöhnlich sterben die Erkrankten nach 5-8 Jahren an Infekt-bedingten Komplikationen der Bettlägerigkeit, wie z. B. Pneumonie (Masuhr und Neumann 2007).

1. 2. 2 Diagnostik

Die AD ist die häufigste Demenzform. Sie ähnelt aber stark den anderen Demenzen. Da sich die Krankheit durch Störungen der Kognition zeigt, diagnostiziert man sie v. a. anhand des klinischen Verlaufs, der körperlichen und neurologischen Untersuchungen, sowie der Labortests. Da der Beginn der AD oft schleichend ist, bemerken meist Familienangehörige erste Symptome der Demenz und nicht der/die Betroffene selbst. Die Fremdanamnese ist deshalb für den behandelten Arzt von großer Bedeutung. Wichtig ist es den Verlauf zu beobachten und zu dokumentieren. Hierzu eignen sich neuropsychologische Tests, wie z. B. ein regelmäßiger *Minimal-Mental-State-Evaluation-Test* (MMSE). Der MMSE ist ein Verfahren, das zur Erstfeststellung kognitiver Defizite, wie auch zur Verlaufskontrolle einer Demenz geeignet ist. In Form eines Interviews werden anhand von 9 Aufgabenkomplexen zentrale kognitive Funktionen überprüft (zeitliche und räumliche Orientierung, Merk-

und Erinnerungsfähigkeit, Aufmerksamkeit, Sprache und Sprachverständnis, außerdem Lesen, Schreiben, Zeichnen und Rechnen). Für jede erfolgreich bewältigte Aufgabe bekommt der Patient einen Punkt. Alle erreichten Punkte werden anschließend aufsummiert. Insgesamt sind 0 bis 30 Punkte möglich, wobei 30 für uneingeschränkte, 0 für schwerstmöglich geschädigte kognitive Funktionen stehen. Werte unterhalb von 25 Punkten sprechen für eine pathologische Beeinträchtigung (Bennett 2000). Weitere Diagnostiken, die den Verdacht auf AD verstärken sind ein verlangsamter Grundrhythmus im Enzephalogramm (EEG), eine verlängerte Latenz der evozierten Potentiale (VEP), eine diffuse Hirnatrophie im Computertomogramm (CT) und/oder eine erhöhte Konzentration des Tau-Proteins im Liquor (Masuhr und Neumann 2007). Im Gegensatz dazu ist die Konzentration an Amyloid- β (A β) im Liquor von AD-Patienten im Vergleich zum Gesunden niedrig (Dubois et al. 2007). Mit absoluter Sicherheit lässt sich die AD bisher jedoch nur über den histologischen Beweis (Plaques und Tangles) erbringen (McKhann et al. 1984). Wichtig ist es auch, andere Ursachen einer Demenz auszuschließen (z. B. sekundäre Demenz). Für gewöhnlich gehen nie alle kognitiven Funktionen auf einmal verloren. Durch unterschiedliche Verluste und Erhalt bestimmter kognitiver Funktionen kann zwischen den einzelnen Demenzen besser unterschieden werden (Bennett 2000).

1. 2. 3 Epidemiologie

Aktuellen Schätzungen zufolge wird die Anzahl Demenz-Kranker (aller Demenzen, nicht ausschließlich AD) in Europa auf etwa 8-10 Mio. geschätzt. Da sich die Altersverteilung in der weltweiten Bevölkerung aber immer mehr nach hinten verschiebt (schätzungsweise wird es bis 2030 zu einer Zunahme der 60-80jährigen um 50% kommen), wird die Zahl für 2050 auf etwa 15 Mio. gemutmaß (Jellinger KA 2005).

1. 2. 4 Pathologie der AD auf Zellebene

Es sind zwei entscheidende pathologische Merkmale, die mit der Entstehung der AD einhergehen, bekannt. Die Entstehung von senilen Plaques aus β -Amyloid (Abb. 1.1) und die Bildung von sogenannten Neurofibrillären Tangles (NFT) aus aggregiertem Tau-Protein (Abb. 1.2).

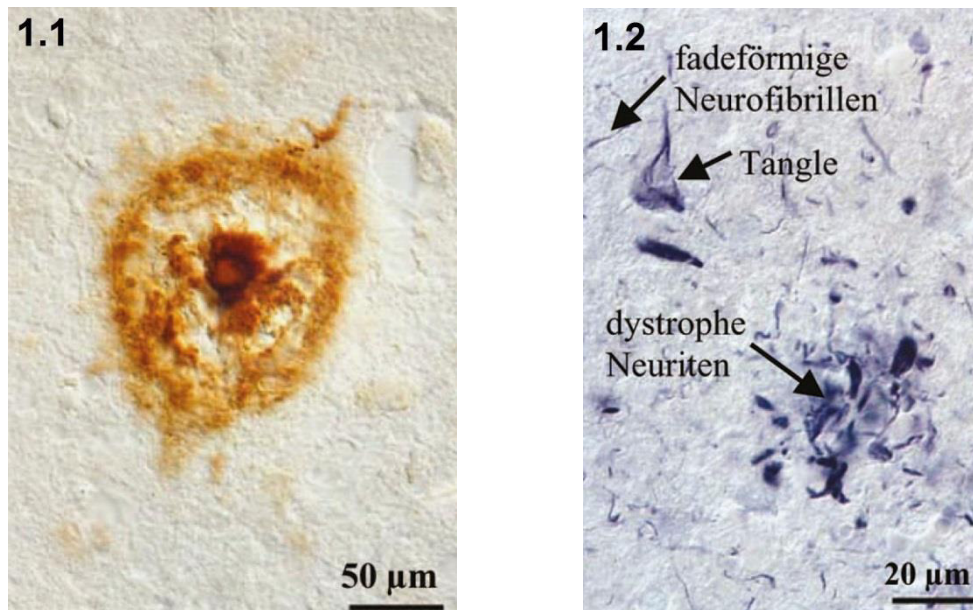


Abbildung 1.1 Histologische Darstellung von β -Amyloid als pathologisches Kennzeichen der AD (Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung)

Abbildung 1.2 Histologische Darstellung von Neurofibrillären Tangles (NFT) als pathologische Kennzeichen der AD (Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung)

1. 2. 5 Amyloid- β

Wie bereits erwähnt, ist der Pathomechanismus der AD v. a. durch Bildung von Plaques und Neurofibrillen (*neurofibrillary tangle*, NFT) geprägt. Auch wenn noch keine Symptome zu erkennen sind, können sich schon eine Vielzahl an NFT und anderen histologischen Markern im Hirn der Betroffenen gebildet haben (Ghebremedhin et al. 1998). Der Hauptbestandteil der Plaques ist das sogenannte A β -Peptid. Es wurde erstmalig von Glenner und Wong als ein 4,2 kDa großes Protein isoliert (Glenner und Wong 1984a). A β entsteht aus dem *Amyloid-Precursor-Protein* (Amyloid-Vorläufer-Protein, APP) (Glenner und Wong 1984b). Dieses ist ein transmembranales Protein mit einer C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer globulären, N-terminalen Domäne. Das APP kann durch drei verschiedene Sekretasen (α , β , γ) in Peptide geschnitten werden. Die α -Sekretase schneidet APP extrazellulär innerhalb der A β -Peptidsequenz. Dieses Fragment, C83 genannt, kann wiederum von der γ -Sekretase geschnitten werden, wobei das Peptid P3 entsteht, welches keine amyloidogenen Eigenschaften besitzt. Wenn aber APP zuerst durch die β -Sekretase und dann durch die γ -Sekretase

geschnitten wird, entsteht ein lösliches, extrazelluläres Fragment. Daraufhin kann das in der Membran verbliebenen APP innerhalb dessen Transmembrandomäne nochmals durch die γ -Sekretase gespalten werden. Hierdurch entsteht das A β -Peptid (Cao, X. und Südhof, T. C. 2001; Tanzi und Bertram 2005).

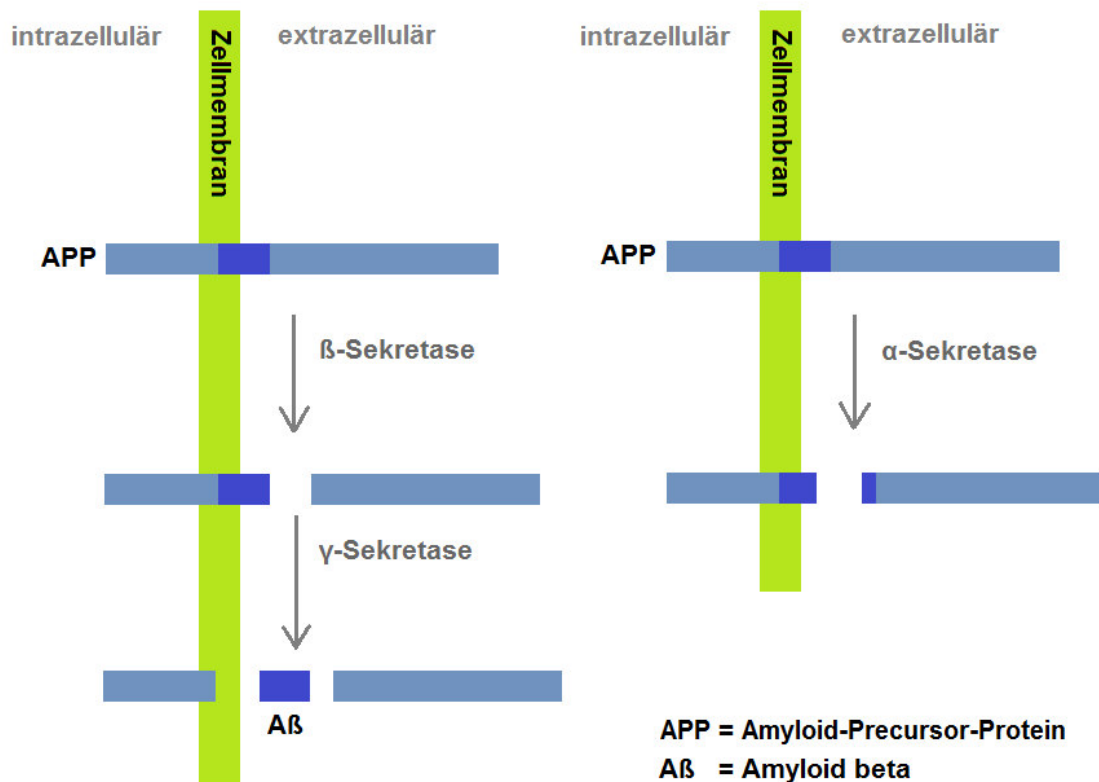


Abbildung 1.3 Prozessierung des *Amyloid-Precursor-Proteins*

Der essentiellen enzymatischen Aktivität der β -Sekretase konnte vor einigen Jahren das Protein BACE (*β -site APP cleaving enzyme*) zugeordnet werden. BACE ist eine Transmembranprotease, die durch eine erste enzymatische Spaltung von APP den N-Terminus des A β -Peptides erzeugt (Vassar 1999). Die Metalloprotease Meprin- β besitzt auch eine β -Sekretase (BACE) Aktivität und ist in der Lage aus APP N-terminale APP-Fragmente unterschiedlicher Länge, in vitro als auch in vivo, zu schneiden (Bien et al. 2012). Bei der Spaltung entstehen Peptide unterschiedlicher Länge. Entscheidend sind die A β -Peptide der Länge 1-40 (A β 40), die die Mehrheit der Spaltprodukte ausmachen und die der Länge 1-42 (A β 42), die nur 10% ausmachen. A β 42 wird als pathogener erachtet als A β 40, da es die Amyloid-Aggregation initiiert und die Bildung von Fibrillen steigert (Small und Duff 2008; Tabaton et al. 2010; Jarrett et al. 1993; Kumar-Singh et al. 2006; Burdick et al.

1992). Nach Lambert ist der schädigende Charakter von A β 42 aber auch auf Oligomerbildung im Inneren der Zelle zurück zu führen (Lambert et al. 1998). Die Ansammlungen von A β 42, egal ob intra- oder extrazellulär, schädigt Organellen und führt schließlich zum Zelluntergang (Chauhan und Chauhan 2006). Die lösliche als auch die fibrilläre Form von A β sind in der Lage oxidativen Stress auszulösen und beide werden wiederum vermehrt durch oxidativen Stress gebildet (Apelt et al. 2004). Wie oben erwähnt, gibt es bestimmte Mutationen, die die FAD verursachen. Eine dieser Mutationen betrifft das APP auf dem Chromosom 21 (Goate et al. 1991). Menschen, die mit einer Trisomie 21 (sogenanntes Down-Syndrom) zur Welt kommen, erkranken häufig früh an AD. Hierbei liegen das gesamte oder Teile des 21. Chromosoms dreifach vor. Durch dieses Triplikat liegt eine dreifache Kopie des Chromosoms für APP vor und damit auch ein 1,5-fach höherer Gen-Dosis-Effekt gegenüber gesunden Menschen, so dass sich bereits in jungen Jahren AD-Plaques entwickeln (Wisniewski et al. 1985; Glenner und Wong 1984b).

1. 2. 6 Preseniline

Die anderen beiden Gene, in denen Mutationen die FAD auslösen können, sind Presenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 (Rogaev et al. 1995) und Presenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al. 1995). Preseniline sind eine Familie von Transmembranproteinen. Sie werden in der alpha-helikalen Region einer der zytoplasmatischen Schleifen in ein größeres N-terminales und ein kleineres C-terminales Stück gespalten. Beide Stücke bilden einen Teil des Gamma-Sekretase-Komplexes. Durch Mutationen in den PS1 und PS2-Genen kommt es zu einer vermehrten Aktivierung der γ -Sekretase und Prozessierung von APP und damit zur vermehrten Bildung von A β (Wolfe et al. 1999). Durch PS1- und PS2-Mutationen kommt es v. a. zur Anreicherung des pathogeneren A β 42-Peptids, während die Konzentration von A β 40 unverändert bleibt (Haass 1997; Baumeister et al. 1998). Die Plaquebildung wird initiiert (Hofmann 2006). In den letzten Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen nachweisen, dass A β tatsächlich bereits intrazellulär gebildet wird. Vermutlich indem PS1 und PS2 im ER an die unreife Form von APP binden und über Bildung eines Sekretasekomplexes β -Amyloid aus dem APP enzymatisch schneiden. A β 42 kann also bereits intrazellulär akkumulieren (Wild-Bode et al. 1997; Baumeister et al. 1998; Hartmann et al. 1997; Cook et al. 1997). Entsprechende Mutationseignisse in den PS-Genen konnten auch in Betroffenen von EOAD nachträglich als ursächlich gefunden werden (Goate et al.

1991; Levy-Lahad et al. 1995; Rogaev et al. 1995). Preseniline sind auch involviert in der Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in Neuronen und Lymphozyten. Durch Mutationen im PS-Gen wird die Kalziumhomöostase gestört. Kalzium kann nicht mehr aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden und die Zelle geht zwangsläufig zugrunde. Dies stellt nicht nur eine Hypothese der Neurodegeneration dar, sondern weist auch auf eine beteiligende Immunstörung im pathologischen Prozess der AD hin (Mattson et al. 2001).

1. 2. 7 Tau

Die NFTs sind das zweite bedeutende histopathologische Korrelat der AD. Die Entstehung dieser ist auf eine Störung der Faltung des Tau-Proteins zurückzuführen. Tau ist ein Protein, dessen codierendes Gen auf dem Chromosom 17q21 liegt (Neve et al. 1986) und multiple Phosphorylierungsstellen aufweist. Bei der Tauexpression ist das alternative Splicing von Exon 10 von besonderer Bedeutung. Je nach Anwesenheit von Exon 10 gibt es 3 oder 4 Mikrotubuli-Bindungsrepeats in der Mikrotubuli-Bindungsdomäne des Proteins. Daher wird es in 3R- und 4R-Tauisoformen eingeteilt (Goedert et al. 1989). Die Hauptfunktion des Tau-Proteins ist die Nukleation und die Stabilisierung der Mikrotubuli (Witman et al. 1976; Trinczek et al. 1995).

Mikrotubuli sind Proteinhohlzylinder, deren Wand aus sich wiederholenden Proteinuntereinheiten, dem α - und β -Tubulin aufgebaut ist. Sie fungieren als lange Transportschienen innerhalb der Axone, an denen Vesikel und Zellorganellen zur Synapse und zurück zum Perikaryon transportiert werden. Um intrazelluläre Transportvorgänge und die Zellteilung zu gewährleisten, sind die Mikrotubuli einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen. Diese sogenannte dynamische Instabilität steht unter Kontrolle von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs), welche wiederum durch Phosphorylierung reguliert werden. Zu diesen MAPs gehört auch das Tau-Protein, das mit axonalen Mikrotubuli assoziiert ist. Es reguliert den neuronalen Vesikel-, bzw. Organellzelltransport, das Axonwachstum und die Verankerung von Enzymen am neuronalen Mikrotubulussystem (Hofmann 2006).

Wird Tau vermehrt phosphoryliert, kann es die Mikrotubuli nicht mehr ausreichend stabilisieren und diese zerfallen. Damit sind der Stofftransport und die -weiterleitung über die Mikrotubuli gestört. Das übrigbleibende hyperphosphorylierte Tau lagert sich zu dicht gepackten paarigen Proteinsträngen (paarige helikale Filamente, PHF) zusammen, die wiederum die sogenannten neurofibrillären Tangles bilden (Grundke-

lqbal et al. 1986; Lee et al. 1991; Alonso et al. 1994). Im Gegensatz zum A β , das sich extrazellulär ablagert, akkumuliert Tau intrazellulär in den Neuronen. Durch diese werden die Neuronen in ihrer Funktion beeinträchtigt, später gehen sie infolgedessen unter (neurofibrilläre Degeneration) (Rassow 2006).

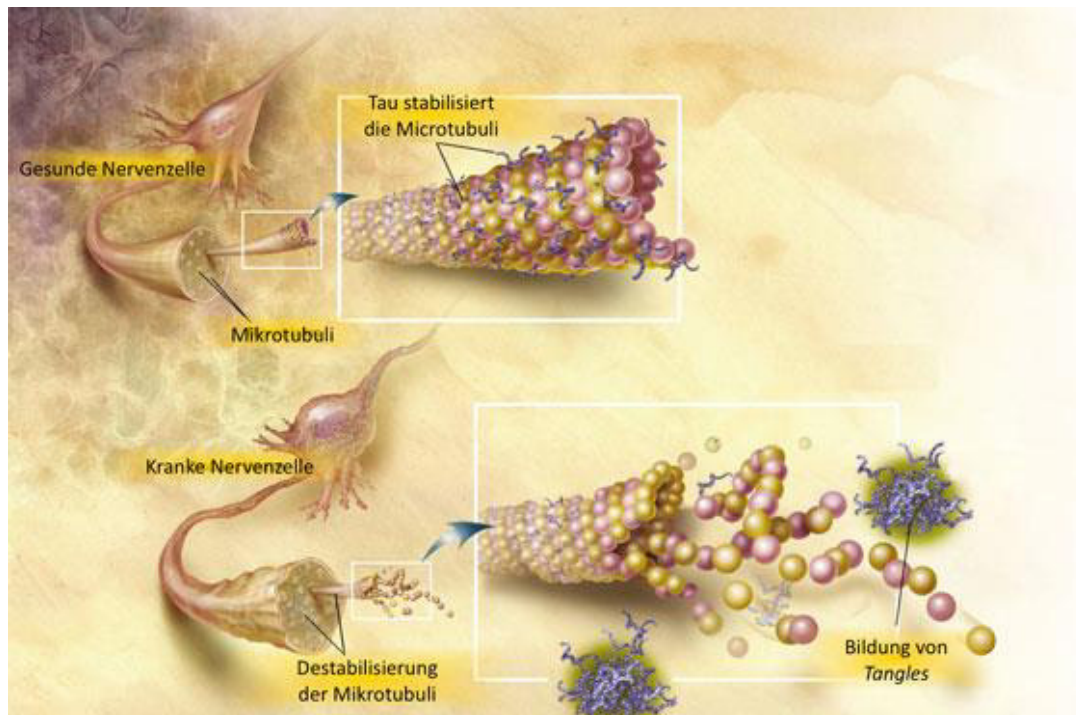


Abbildung 1.4 Pathologische Veränderung der Nervenzellen bei Tauopathie

In gesunden Nervenzellen stabilisiert Tau die Mikrotubuli. In Nervenzellen von AD-Erkrankten kann es diese Funktion nicht mehr ausüben, es fällt von den Mikrotubuli ab und aggregiert in der Zelle (Paquet 2012).

Die Tau-Phosphorylierung wird über verschiedene Proteinkinasen reguliert. Im Gewebe Nichterkrankter finden sich in einem Mol Tau ca. 2-3 Mol Phosphat, aber im Gewebe von Patienten mit AD steigt der Phosphatgehalt um das 3- oder 4fache an (Lee et al. 1991; Khatoon et al. 1994). Eine Vielzahl von Proteinen mit Tau-Phosphorylierungsaktivität, wie Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3) sind identifiziert wurden (Wang und Liu 2008). Die Hyperphosphorylierung von Tau ist vermutlich eine Folge von gesteigerter Proteinkinaseaktivität (Pei et al. 1999) und verminderter Aktivität der Proteinphosphatase (Gong et al. 1995). Es ist noch nicht ganz sicher, ob eine Hyperphosphorylierung von Tau wirklich neurotoxisch wirkt. Sie stellt jedoch die Vorbedingung für die Aggregation in vivo dar. Es hat sich jedoch

gezeigt, dass die klinische Progredienz der Krankheit und die Menge an hyperphosphoryliertem Tau in bestimmten Arealen korrelieren (Holzer et al. 1994).

1. 2. 8 Amyloid-Hypothese und *Dual Pathway*

Aus den zuvor beschriebenen strukturellen Störungen lassen sich zwei wesentliche Hypothesen zur Entstehung der pathologischen Mechanismen im Gewebe AD-Kranker herleiten. Zu diesen zählen die Amyloid-Hypothese und der *Dual Pathway*. Die Amyloid-Hypothese beschreibt den Pathomechanismus als eine Serie von Kausalitäten. Eine Erhöhung von A β ist dabei das beginnende Moment, welches zur Tau-Hyperphosphorylierung führt (Hardy und Selkoe 2002; Tanzi und Bertram 2005). Die zweite Theorie, die die AD-Pathogenese erklärt, ist die Theorie des *Dual Pathway*. Diese geht davon aus, dass A β -Bildung und Tau-Hyperphosphorylierung durch separate übergeordnete Mechanismen entstehen. Hierzu gehören z. B. die Hypothese der ApoE-Funktion, GSK3-Aktivität und die Retromer-Hypothese (Small und Duff 2008).

Die Amyloid-Hypothese und die Theorie des *Dual Pathway* unterscheiden sich wesentlich. Entweder verursacht eine vermehrte Bildung von A β eine unaufhaltbare Hyperphosphorylierung von Tau, oder es existiert ein treibender Mechanismus, der sowohl die A β -, als auch die Tau-Pathologie auslöst. Beide Theorien müssen aber nicht streng getrennt voneinander betrachtet werden. Viel eher könnte es sein, dass sich beide ergänzen (Small und Duff 2008).

Eine andere Hypothese, die derzeit getestet wird, geht davon aus, dass Tau allein der entscheidende pathologische Faktor der Neurodegeneration ist. Roberson et al. untersuchten 2007 z. B. Mäuse, die eine Mutation im humanen APP-Gen, sowie eine variable Anzahl (zwei, eine oder gar keine) an Tau-Genkopien aufwiesen. Da alle Mäuse das APP-Gen exprimierten, entwickelten auch alle A β -Plaques, egal ob Tau anwesend war oder nicht. In allen drei Gruppen wurde außerdem anhand des Morris-Wasserlabyrinth-Tests die Gedächtnisleistung evaluiert. Der Morris-Wasserlabyrinth-Test ist ein experimenteller Verhaltenstest, der der Untersuchung räumlich-navigatorischer Lernvorgänge dient. Das Versuchstier muss schwimmend eine unter der Wasseroberfläche befindliche Plattform finden, sich deren Position merken und anschließend wiederfinden. Gemessen wird die Zeit bis zum Erreichen der Plattform. Im Versuch von Roberson et al. war die Gruppe mit zwei Tau-Genen am schwersten beeinträchtigt, die Gruppe mit nur einem Gen war weniger stark eingeschränkt und die Leistung der Gruppe ohne Tau-Gen entsprach in etwa den

Mäusen, die keine pathologische Gen-Komponente aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass eine Abwesenheit von Tau Verhaltensveränderungen entsprechend der AD verhindern würde (Roberson et al. 2007).

Ein anderes Argument, das für Tau als alleinige Ursache des pathologischen Prozesses spricht ist, dass eine Mutation im *mikrotubli-associated-protein-tau* (MAPT)-Gen auf Chromosom 17 ebenfalls alleiniger Auslöser einer Neurodegeneration ist. Diese Mutation verursacht eine erbliche Form der frontotemporalen Demenz, die sog. *frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosom 17 (FTDP-17)*. Sie wird autosomal-dominant vererbt und beinhaltet drei wesentliche klinische Merkmale: Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen, sowie motorische Störungen. Man vermutet, dass der hier zu Grunde liegende Pathomechanismus eine vermehrte Tauaggregation beschreibt, die histologisch auch in AD-Erkrankten wiederzufinden ist (Goedert und Spillantini 2000).

1. 2. 9 Apolipoprotein E und Glykogen-Synthasekinase 3

Apolipoprotein E4 (ApoE4) ist ein wichtiger, erkrankungsmodulierender, genetischer Faktor, der v. a. die LOAD bedingt. Es existieren jedoch auch Nachweise, dass er die Entstehung der EOAD ebenfalls beeinflusst (Pastor et al. 2003). Andere Gene, die mit AD assoziiert sind, sind TREM2, MEF2C und EPHA1. Wie genau es zur Neurodegeneration durch Mutation in diesen Genen kommt, ist noch nicht vollständig geklärt (Cella et al. 2003; Colonna 2003; Wang et al. 2014; Nowakowska et al. 2010; Carrasquillo et al. 2011).

Verglichen mit anderen genetischen Varianten, erhöht besonders das Vorhandenseins des ApoE4-Gens die Wahrscheinlichkeit an LOAD zu erkranken (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993). ApoE hat große Bedeutung im Lipoproteinstoffwechsel. Defekte im ApoE können verschiedene familiäre Dyslipoproteinämien begünstigen. In jüngerer Zeit zeigte sich aber, dass ApoE auch in verschiedenen biologischen Prozessen (z. B. AD), sowie Immunregulation und Kognition eine entscheidende Rolle spielt. Die drei wichtigen Allele des ApoE sind ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Die Genotypen ApoE 4/4 und ApoE 3/4 werden mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht, an AD zu erkranken. Der Genotyp ApoE 2/3 ist dagegen mit einem verminderten Risiko für die AD assoziiert. Auch wenn die Pathologie der Krankheitsentstehung in Bezug auf ApoE4 bei der AD noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es bereits Hinweise, die auf eine

Wechselwirkung des ApoE mit Amyloid hindeuten (Wisniewski und Frangione 1992). Bei Probanden, die ApoE4-Allel aufwiesen, wurde ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und einer vermehrten Bildung von A β (Galasko et al. 1998) und erhöhtem hyperphosphoryliertem Tau festgestellt (Glodzik-Sobanska et al. 2009; Golombowski et al. 1997). Es wird vermutet, dass ApoE den proteolytischen Abbau des APPs steigert, sowohl intra- als auch extrazellulär, so dass A β vermehrt akkumuliert (Jiang et al. 2008). Es kommt in den Betroffenen zu einer vermehrten Plaque-, wie auch NFT-Bildung (Tiraboschi et al. 2004).

Glykogen-Synthase-Kinase-3 β ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche Bestandteil verschiedener Signalwege ist und eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse spielt (Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und embryonale Entwicklung). Von den 40 Phosphorylierungsstellen, die in unlöslichen Tau-Proteinen in den Gehirnen AD-Erkrankter identifiziert wurden, ist GSK3 β in der Lage 23 zu phosphorylieren (Hanger et al. 2009). Die Aktivität der GSK3 β wird einerseits nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase B (z. B. Insulinsignalweg) und andererseits bei Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Zerfall des aktiven Degradationskomplexes gesenkt. Beide Möglichkeiten sind mit Augenmerk auf die AD von großer Wichtigkeit. Zum einen wurde entdeckt, dass A β eine antagonistische Wirkung an Insulin-Rezeptoren zeigt, wodurch es intrazellulär nicht zu einer Phosphorylierung der GSK3 β durch Proteinkinase B kommt, bzw. wodurch der Phosphorylierungsfortschritt von Tau nicht gestoppt wird (Townsend et al. 2007). Auch die ApoE-Isoformen regulieren die GSK3-Aktivität. ApoE2 inhibiert nach Rezeptorbindung die GSK3 β -Phosphorylierung und senkt das Tau-Phosphorylierungslevel (Hoe et al. 2006). ApoE4 dagegen zeigt von allen im Menschen vorkommenden Isoformen von ApoE die stärkste Aktivierung der GSK3 β (Cedazo-Minguez et al. 2003). Vermutet wird, dass ApoE4 an die LDL-Corezeptoren LRP5/6 des wnt-Signalweges bindet (Beisiegel et al. 1989; Herz und Bock 2002), wodurch intrazellulär der Degradationskomplex intakt und somit GSK-3 β aktiv bleibt (Caruso et al. 2006; Cedazo-Minguez et al. 2003; Strittmatter und Roses 1996; Hernández et al. 2010).

1. 2. 10 Retromer und wnt-Signalweg

Ein anderer Pathomechanismus, der bei der AD-Entstehung eine Rolle spielt, ist eine Störung im Retromer-Signalweg. Das Retromer ist ein Proteinkomplex, der beim Recycling von Transmembranrezeptoren auf dem Weg von den Endosomen zum

Golgi-Apparat eine entscheidende Rolle spielt (Pfeffer 2001). Zum Retromer in komplexen Säugetieren gehören die Proteine VPS35, VPS26, VPS29, und SNX1/2, die im menschlichen Gehirn in großer Menge vorhanden sind (Haft et al. 2000). Es konnten niedrigere Level an VPS35, VPS26 und sorLA in menschlichem Hirngewebe von AD-Patienten (Scherzer et al. 2004; Small und Gandy 2006) festgestellt werden. Ein Defizit im Retromer-Signalweg führt zu einer vermehrten Bildung von A β . SorLA bindet an APP und fungiert als eine Art Selektierungsrezeptor für APP. Wenn wenig sorLA exprimiert wird, kommt es auch weniger zur Bindung an APP. APP verweilt im entsprechenden Kompartiment, gerät häufiger in Kontakt mit Spaltenzymen (β -Sekretasen) und kann vermehrt zu A β gespalten werden (Andersen et al. 2005; Small und Gandy 2006). Genetische Veränderungen im sorLA-Gen konnten in Menschen mit LOAD nachgewiesen werden (Rogaeva et al. 2007). Der Retromer-Signalweg spielt aber auch eine Rolle im wnt-Signalweg. Wnt bindet im Golgi-Apparat an ein transmembranes Chaperon, das *wntless* (WLS) genannt wird (Hausmann et al. 2007). Dieser Komplex gelangt an die Zelloberfläche, wo sich wnt von WLS wieder löst und in den Extrazellulärspalt abgegeben wird. WLS wird von den Endosomen über Endozytose aufgenommen, wo es an den Retromer-Komplex bindet und wieder zurück zum Golgi-Apparat transportiert wird. Im Falle einer Beeinträchtigung des Retromer-Signalweges würde WLS zu den Lysosomen transportiert werden, wo es zu dessen Abbau käme (Eaton 2008). Weniger WLS bedeutet weniger wnt-Ausschüttung, dadurch weniger Aktivierung des wnt-Rezeptorkomplexes und damit eine vermehrte Aktivierung von GSK3, wodurch zuletzt wieder vermehrt phosphoryliertes Tau entsteht (Small und Duff 2008). Auch Presenilin 1 ist in der Lage die GSK3-Phosphorylierung zu beeinflussen. PS1 kann an Tau und an die GSK3 binden. Dadurch kommt es häufiger zur Phosphorylierung von Tau durch die GSK3. Durch bestimmte Mutationen im PS-Gen wird die GSK3 zunehmend gebunden und dadurch kann vermehrt Tau phosphoryliert werden (Takashima et al. 1998).

1. 2. 11 Tau-Oligomere als Ursache der Neurodegeneration

Die Vermutung, dass A β -Plaques und NFTs als Aggregationsendprodukte die alleinige Ursache der Neurodegeneration sind, ist inzwischen umstritten. Vermutet wird, dass die löslichen, oligomeren Aggregationsprodukte von A β und Tau die mögliche Ursache der Krankheit ausmachen. Z. B. entdeckten Maeda et al. granuläre Tau-Oligomere, die verschiedene toxische Konformationen annehmen und sich

schließlich in NFTs einbauen (Maeda et al. 2006). In weiteren Versuchen konnte entsprechend bewiesen werden, dass sich vermehrt Tau-Oligomere im Frontalcortex nachweisen lassen, bevor sich erste NFTs gebildet haben, (Maeda et al. 2007). Schließlich konnten Flach et al. beweisen, dass nicht die Tau-Filamente selbst die Zelle in ihrer Funktion beeinträchtigen, sondern, dass oligomere Tau-Aggregate die Zellvitalität stören (Flach et al. 2012).

Ähnliche Erkenntnisse erbrachten auch Untersuchungen von Santacruz et al. 2005. Sie verwendeten in ihrer Studie Mäuse mit konditioneller Tau-Expression, die vermehrt NFTs ausbildeten und entsprechend vermehrt neuronale Verluste erlitten, sowie spezifisch pathologische Verhaltensveränderungen zeigten. Durch Gabe von Doxycyclin, welches die Expression von transgenem Tau unterdrückt, sank die Tau-Konzentration und die Anzahl an Neuronen stabilisierte sich. Als Resultat stieg die Konzentration an NFT weiter an (Santacruz et al. 2005).

Sollte sich diese Thesen als richtig erweisen, könnte es möglich sein, dass NFTs und Plaques gar keine gefährlichen Strukturen darstellen, sondern durch die Fibrillenbildung die toxischen Oligomere sequestriert werden und somit deren Ausbreitung gehemmt wird (Brunden et al. 2008).

1. 2. 12 Andere Entstehungstheorien der AD

Eine weitere Rolle in der AD-Pathogenese spielt der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh). Die Konzentration an ACh ist in AD-Erkrankten niedriger als in Gesunden (Arendt et al. 1992; Arendt et al. 1984a). Da ACh eine entscheidende Rolle als Neurotransmitter bei Erinnerungs- und Lernprozessen spielt, verursacht ein Verlust kognitive Schäden, sowie Verhaltens- und Gedächtnisstörungen (Coyle et al. 1983; Arendt et al. 1984b).

Als weitere mögliche Ursache der AD wird ein erhöhtes Blutcholesterol (Hypercholesterinämie) diskutiert, welches ebenfalls zu vermehrtem oxidativen Stress führt. Hiervon ist insbesondere das LDL-Cholesterin, ein Teil des Gesamtcholesterins, betroffen. Dieses wird durch freie Radikale oxidiert und anschließend von Makrophagen vermehrt aufgenommen. So können sich Fettansammlungen, sogenannte Plaques, an der Wand von Blutgefäßen bilden und die Gefäßwand zunehmend einengen (Pappolla et al. 2002). Nach Nelson kann in einer chemischen Reaktion Cholesterol durch APP und auch durch A β zu β -Hydroxycholesterol umgesetzt werden, ein sogenanntes proapoptotisches Oxysterol, das bereits in kleinen Konzentrationen toxisch wirkt (Nelson und Alkon

2005). Studien zeigten bereits, dass Hypercholesterinämie, Bluthochdruck und Arteriosklerose Risikofaktoren der AD sind (Jellinger KA 2005). Nun konnte gezeigt werden, dass Probanden, die an Hypercholesterinämie litten und Statine (Cholesterinsynthesehemmer) einnahmen, weniger häufig an AD erkrankten als die Kontrollgruppe (Jick et al. 2000).

Mitochondrien spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des oxidativen Stresses. Geschädigte Mitochondrien führen zum Zelltod. In der AD-Pathogenese scheint v. a. eine Fehlfunktion der mt (mitochondriale) DNA eine entscheidende Rolle zu spielen. So wurde in einer Studie von Cordosco 2004 die Wirkungen von A β auf menschliche Teratokarzinom (NT2)-Zellen getestet, die endogene mtDNA exprimieren. Eine Zelllinie exprimierte mtDNA von AD-Patienten (AD cybrids) und die andere mtDNA aus altersgleichen Kontrollpersonen (Kontrolle cybrids). Unter A β -Exposition kam es in den AD NT2 Zellen in größerem Ausmaß zu einem programmierten Zelltod als in der Kontrollgruppe (Cardoso et al. 2004). Gleichfalls wird vermutet, dass in vorgeschädigten Mitochondrien weniger Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird, es dafür aber zur vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt, die die Mitochondrien zusätzlich schädigen. Dadurch kann der Energiebedarf der Zelle nicht mehr gewährleistet werden und es kommt letztlich zum Zelltod (Zhu 2004).

Eine andere Theorie beschreibt die mitochondriale Dysfunktion in Astrozyten als Teilpathologie der AD. A β verursacht vermehrt oxidativen Stress, wodurch es zu einer Potentialstörung in den Mitochondrien der Astrozyten kommt, und auch zur Aktivierung von NADPH-Oxidase, die wiederum vermehrt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt (Abramov et al. 2004).

Ein letzter Risikofaktor, der derzeit diskutiert wird, sind Schädigungen, wie traumatische bedingte Hirnverletzungen (sog. Boxer-Demenz) oder Insulte des zentralen Nervensystems. Diese sorgen dafür, dass es zur inflammatorischen Reaktion kommt und vermehrt Zytokine freigesetzt werden, die das Hirngewebe zusätzlich schädigen (Summers 2004).

1. 3 Aktuelle Therapieansätze der Tau-Pathologie

Bisher kann die AD noch nicht geheilt werden. Es existieren wenige Medikamente, die die Symptome gering beeinflussen, wie z. B. Acetylcholinesterasehemmer, wie Donepezil, Rivastigmin oder Galantamin und NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie Memantin. Diese können jedoch nicht das Voranschreiten der Krankheit stoppen.

Verschiedene Wirkstoffe, die das Voranschreiten der Krankheit verhindern oder zumindest verlangsamen sollen, werden derzeit entwickelt und getestet. Solche sind z. B. Wirkstoffe, die die Bildung oder Aggregation von A β verhindern, den Abbau von A β fördern oder die Tau-Phosphorylierung und -Aggregation unterbinden. Salomon et al. stellten die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe in einer Tabelle dar (Tab. 1.1) (Salomone et al. 2012). Keiner der Wirkstoffe kam bisher über Phase II, bzw. III der klinischen Forschung hinaus.

Tabelle 1.1 Darstellung einiger bisher erprobter Wirkstoffe in der Behandlung der AD (Salomone et al. 2012)

Medikament	Für AD relevanter Wirkmechanismus	Phase der klin. Studie	Ergebnis
Rosiglitazon	PARP-Inhibitor	3	Ineffektiv
Semagacestat	γ -Sekretase-Inhibitor	3	Vorzeitig abgebrochen
Tarenflurbil	γ -Sekretase-Modulation	3	Ineffektiv
Tramiprosat	Hemmung der A β -Oligomerisierung	3	Ineffektiv
Scylloinositol	Hemmung der A β -Oligomerisierung	2	Ineffektiv
Bapineuzumab	Beseitigung von A β	3	Abgebrochen
Solaneuzumab	Beseitigung von A β	3	Abgebrochen
Lithium	Hemmung der Tauphosphorylierung	2	Verbesserung der Klinik, Abnahme P-Tau im Liquor
Methylthioninium-chlorid	Hemmung der Tauaggregation	2	Verbesserung der Klinik
Nilvadipin	Beseitigung von A β	Open-Label	Verbesserung der Klinik
Latrepiridin	Schutz der Mitochondrien	3	Ineffektiv

1. 3. 1 Immunisierung als therapeutischer Ansatz

Als Immunisierung wird das Einbringen eines Immunogens in den Körper eines Menschen bezeichnet, welches daraufhin eine Immunantwort auslöst. Das Immunsystem kann z. B. gezielt mit Krankheitserregern in Kontakt gebracht werden, damit es anschließend vor einer Infektionskrankheit geschützt ist (sogenannte Impfung). Unterschieden wird eine aktive von einer passiven Immunisierung.

Bei der aktiven Immunisierung entwickelt das Immunsystem aktiv Antikörper gegen Antigene in Form von abgeschwächten Erregern oder deren Bestandteilen, mit denen der Organismus Kontakt hatte. Der Erfolg tritt erst nach einigen Tagen bis Wochen ein, hinterlässt in der Regel aber eine lang andauernde Immunität.

Bei der passiven Immunisierung werden dem Patienten direkt Antikörper gegen das Antigen verabreicht. Diese können von einem anderen Patienten, einem Tier oder aus gentechnischer Produktion stammen. Die passive Immunisierung wirkt sofort, ist aber nicht nachhaltig, da die Antikörper vom Körper abgebaut werden. Jedoch ist sie sicherer, da weniger Nebenwirkung, wie z. B. Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen auftreten.

1. 3. 2 Aβ als Zielstruktur der Immunisierung

Im Falle der AD wird nach einem therapeutischen Zugang durch Immunisierung gesucht, um die pathologischen Ursachen der Krankheitsentstehung zu verhindern, aufzuhalten oder sie sogar rückgängig zu machen. So versucht man u. a. in die Entstehung von AD typischen Plaques einzugreifen, mittels einer Immunisierung mit Amyloid-Bruchstücken, die die Amyloid-Aggregation verhindern sollen. Da sich in Tierversuchen viele Erfolge bezüglich einer Immunotherapie verzeichnen ließen, wurde der erste Versuch einer aktiven Immunisierung am Menschen mittels *AN1792* durchgeführt. *AN1792* besteht aus präaggregiertem Aβ1-42 und *QS21* (ein Adjuvans, das die T-Lymphozyten aktiviert) (Wisniewski und Frangione 2005). Während der Versuche konnte eine anti-Aβ-Immunreaktion nachgewiesen werden (Pride et al. 2008), jedoch entwickelten einige immunisierte Probanden starke Nebenwirkungen in Form einer aseptischen Meningoenzephalitis (Wisniewski und Frangione 2005; Gilman et al. 2005; Boche und Nicoll, James A R 2008; Schenk 2002). Spätere autopsische Untersuchungen der Gehirne der Betroffenen zeigten, dass große Areale frei von Plaques waren, ähnlich der Ergebnisse, die sich in Tierversuchen nachweisen ließen (Boche und Nicoll, James A R 2008; Bombois et al. 2007; Ferrer et al. 2004; Masliah et al. 2005; Nicoll, James A R et al. 2006; Nicoll, James A R et al. 2003). Auch konnten in einzelnen Probanden kognitive Verbesserungen nachgewiesen werden, wie auch eine Verlangsamung des Krankheitsprogression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Wisniewski und Frangione 2005; Hock et al. 2003).

Es gibt noch einige andere Studien, die sich mit einer aktiven Immunisierung mittels Aβ beschäftigen, deren Ergebnisse jedoch noch ausstehen. Z. B. entwickelte *Novartis* 2012 *CAD106* (Winblad et al. 2012; Wisniewski 2012), bestehend aus dem Aβ-Fragmenten 16. Schwere Nebenwirkungen ergaben sich nicht, jedoch konnte auch kein signifikanter klinischer Unterschied in der kognitiven Leistung zwischen der

Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe gezeigt werden. Die Phase II-Testung von *CAD106* läuft seit Februar 2013 (Wisniewski und Goñi 2014).

Eine andere Studie untersuchte die Wirkung von *ACC001*. Dies besteht aus dem A β -Fragmenten 16, welches an einen Carrier gebunden ist, und aus Adjuvans QS21 (Ryan und Grundman 2009). Hier wurden Mimitope erzeugt, d. h. synthetische Peptide die spezifisch den unveränderten A β -N-Terminus erkennen können (Schneeberger et al. 2009). Dieser Versuch wurde später erweitert, in dem die Mimitope auch verändertes A β erkennen, welches in den Plaques vorkommt (Saido et al. 1995; Frost et al. 2013).

AC Immune arbeitet an einem Phase I/IIa-Trial, in welchem *AC124* getestet wird. Dieser soll eine humorale Immunantwort auf Kontakt mit A β , das sich in β -Faltblattkonformation befindet, auslösen (Muhs et al. 2007).

Da im Tierversuch ebenso eine Reduzierung des A β -Spiegels und ein positiver Effekt auf die Kognition durch passive Immunisierung gezeigt werden konnte, wurden erste Versuche auf den Menschen übertragen (Bard et al. 2000; DeMattos et al. 2001). Zu den am weitesten fortgeschrittenen Antikörperpräparaten gehören die Phase III-Testung von *Bapineuzumab* und *Solanezumab*. *Bapineuzumab* ist eine humane Version des monoklonalen Mäuse-Antikörpers 3D6, der spezifisch für die A β -Reste 1-15 ist. 3D6 kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und an Plaques binden und somit eine Fc-vermittelte Phagozytose von A β durch die Mikroglia einleiten (Bard et al. 2000; Bard et al. 2003). *Solanezumab* ist die humane Version von mAb 266, welches ein Epitop für die Reste 16-24 von A β besitzt. Es bindet monomeres, lösliches A β und senkt somit deren Spiegel im Plasma (Bard et al. 2000; Bard et al. 2003). Vermutlich sequestriert *Solanezumab* peripheres A β , so dass es vermehrt ausgeschieden werden kann (Wisniewski und Goñi 2014).

Einen anderen Ansatz fand die *Alzheimer's Prevention Initiative* (API). Sie testeten Individuen mit PS1 Mutation (frühe und aggressive Form der AD) auf *Crenelumab*, einen monoklonalen Antikörper, der lösliches, oligomeres und fibrilläres A β bindet (Adolfsson et al. 2012) und dessen Aggregation verhindert. Die Ergebnisse dieser Studie stehen noch aus.

Ein anderer Ansatz wurde mit intravenösen Immunglobulin (IVIG) begonnen. In Probanden, die IVIG erhielten, konnte ein geringeres Risiko nachgewiesen werden an AD zu erkranken (Fillit et al., 2009). Diese Ergebnisse konnten aber in zwei

anschließend durchgeführten Studien nicht bestätigt werden (Lemere 2013; Dodel et al. 2013).

1. 3. 3 Tau als Zielstruktur der Immunisierung

Zahlreiche Versuche einer Immunisierung gegen A β sind gescheitert, da es hierbei zwar zur Auflösung von Amyloid-Plaques kam, jedoch nicht zur Verbesserung der kognitiven Leistung. Seit Beginn dieser Arbeit sind verschiedene neue Immunisierungsstudien erschienen, diese wenden sich immer mehr einer Immunisierung gegen Tau zu. Hierbei gibt es bereits einzelne Versuche einer aktiven, wie auch passiven Immunisierung. Der Vorteil einer aktiven Immunisierung ist die Stimulierung des Immunsystems, bei der auch Gedächtniszellen gebildet werden. Eine aktive Immunisierung kann also mehrere Jahre bis lebenslang anhalten. Bei der passiven Immunisierung vermittelt die Gabe von Antikörpern einen schnell wirksamen, aber nur kurz anhaltenden Schutz gegen Infektionen oder andere pathologische Zustände. Jedoch kommt es kaum zu immunologischen Nebenwirkungen.

Den ersten Versuch einer aktiven Immunisierung mit Tau unternahmen Rosemann et al. 2006. Hierzu wurden Mäuse mit rekombinantem humanem Tau-Protein geimpft. Während der Versuche kam es aber bei den Versuchstieren vermehrt zur Bildung NFT-ähnlicher Strukturen, axonalen Schäden, Gliose und Bildung mononukleärer Infiltrate. Eine aktive Immunisierung mit Tau selbst ist demzufolge nicht geeignet (Rosemann et al. 2006).

Versuche mit phosphorylierten kurzen Tau-Peptiden zeigten bessere Ergebnisse. Asuni et al. konnten 2007 mit Hilfe von Phospho-Tau-Epitopen Tau-Aggregate in Mäusen beseitigen. Diese Epitope enthielten die Aminosäuren 379-408 des Tau-Proteins. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur das Adjuvans erhielt, besserten sich die motorischen Defizite in der behandelten Gruppe. Die Antikörper können demzufolge die Blut-Hirn-Schranke überwinden und phosphoryliertes Tau binden (Asuni et al. 2007).

Einen anderen Ansatz fanden Boimel et al. Sie impften Mäuse, die ein zweifach mutiertes Tau exprimieren und NFTs bereits im Alter von 6 Monaten entwickeln, mit Peptiden, die verschiedene Phospho-Epitope enthielten (Tau195-213, Tau207-220, Tau224-238). Es zeigte sich, dass die Anzahl an Tau-Aggregaten, bzw. NFTs in verschiedenen Hirnregionen der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur Adjuvans erhielt, abnahm. Neurologische Defizite, inflammatorische Reaktion

oder andere schwere Nebenwirkungen konnten nicht nachgewiesen werden (Boimel et al. 2010).

Anschließend wurden in einer Studie von Boutajangout et al. Mäuse, die das PS1-Gen trugen mit Tau379-408 intraperitoneal geimpft. Es konnte in dieser Gruppe eine Verminderung der Tau-Aggregate im Vergleich zur Kontrolle, die nur Adjuvans erhielt, nachgewiesen werden. Ebenso schnitt die Versuchsgruppe besser in Lern- und Gedächtnistests ab. Die Impfung konnte demzufolge den kognitiven Verfall bremsen (Boutajangout et al. 2010).

Einer der ersten Versuche einer passiven Impfung wurde an Mäusen mit Hilfe von PHF1-Antikörpern durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse intraperitoneal mit PHF1-Antikörpern immunisiert (PHF1 erkennt an Serin 404 und 396 phosphoryliertes Tau). Die Tau-Aggregat-Konzentration im Hippocampus war in der behandelten Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe, welche Maus-IgG erhielt. Ebenso schnitten sie besser in Verhaltenstests ab als die Kontrollgruppe (Boutajangout et al. 2011).

Ein anderer Versuch der passiven Immunisierung gelangen Chai et al. 2011. Hier wurden Mäuse ebenfalls mit PHF1-Antikörpern, aber auch Antikörpern gegen MC1 immunisiert. Beide erkennen NFTs, MC1 speziell die Aminosäuren 312-342 von Tau. Auch hier konnte immunhistochemisch und mit Hilfe von ELISA eine Verminderung der NFTs im Cortex im Vergleich zur Kontrollgruppe (erhielt IgG1) nachgewiesen werden. Ebenso zeigte die immunisierte Gruppe bessere Ergebnisse auf dem Rotarod als die Kontrollgruppe (Chai et al. 2011).

Kürzlich entwickelten Castillo et al. einen Anti-Tau-Oligomer-spezifischer Antikörper (*TOMA*). Dieser erkennt nicht die lösliche Form von Tau, hat aber eine hohe Affinität zu Tau-Oligomeren. Mit diesem wurden Mäuse passiv immunisiert. Die biochemischen und immunhistochemischen Evaluationen zeigten einen Rückgang der Tau-Oligomere in den Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur IgG verabreicht bekamen (Castillo-Carranza et al. 2014; Castillo-Carranza et al. 2013).

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten soll in dieser Studie eine Immunisierung mit sog. pseudophosphorylierten Tau-Peptiden untersucht werden. Beim Verfahren der Pseudophosphorylierung werden Aminosäuren ausgetauscht (z. B. Serin, bzw. Threonin gegen Glutamat). So wird eine Art Phosphorylierungsmimikry erzeugt, welches nicht durch Phosphatasen entfernt werden kann und somit eine hohe

Immunogenität besitzt. Weitere Vorteile sind, dass es recht stabil und billig herzustellen ist. Außerdem muss es, aufgrund der ausreichenden Antikörpergröße, nicht an Carrier gekoppelt werden (siehe Kap. 3.3).

2 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der motorischen Leistungsfähigkeit von Tau-transgenen Mäusen nach aktiver Immunisierung mit pseudophosphoryliertem Tau-Antigen als potentiell therapeutische Intervention zur Inhibierung der Tau-Protein-Aggregation und damit deren Einfluss auf die Motoneurondegeneration.

Hierbei wurden drei unterschiedliche Gruppen untersucht. Eine Tau-immunisierte Gruppe, eine Mock (Adjuvans)-immunisierte Gruppe und eine unbehandelte Kontrollgruppe. Die methodische Untersuchung soll motorische und morphometrische Veränderungen innerhalb der Versuchsgruppen aufdecken und analysieren, anhand von Rotarod-Tests, sowie der Quantifizierung von α -Motoneuronen.

Hierzu werden weibliche Mäuse, die transgen für die humane 0N4R-Tau-Isoform mit der Prolin-301-Leucin-Mutation (P301L) sind, verwendet. Dies führt zu einer frühen Tau-Aggregation mit NFT-Bildung und einer Neurodegeneration.

Ein neuer Ansatz dieser Studie ist die Immunisierung mittels pseudophosphorylierter Tau-Fragmente. Die Ergebnisse der Gruppe, die diese Tau-Immunisierung erhält, werden mit denen einer sog. Mock-Gruppe, welche eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems mittels kompletten Freundschens Adjuvans erhält, und einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Es soll geklärt werden, ob die Tau-Immunisierung die Tau-Pathologie verringert. Sind also motorischen Defizite im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, vor allem im Vergleich zur Kontrollgruppe, weniger stark ausgeprägt? Können Tau-immunisierte Tiere länger auf dem Rotarod verweilen? Kommt es durch die Immunisierung zu einer verringerten Neurodegeneration der α -Motoneurone in den Vorderhörnern?

3 Methoden und Materialien

3. 1 Studiendesign

Getestet wurde der Einfluss einer therapeutischen, aktiven Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Protein-Fragmenten auf die Tau-Protein-Aggregation, bzw. die Ausbreitung der Tau-Pathologie und der damit verbundenen Neurodegeneration in einem Tau-transgenen Mausmodell. Hierzu wurden motorische Testungen, wie auch anatomische und biochemische Analysen auf Zellebene unternommen. Zur Erfassung der motorischen Veränderungen wurden Rotarod-Tests durchgeführt. Nach Abschluss dieser Verhaltensversuche wurden die sensomotorischen Verhaltensdaten mit anatomischen Parametern verglichen. Hierzu wurden die Versuchstiere getötet und aus den Rückenmarksquerschnitten einzelner Versuchstiere Anzahl und Durchmesser der α -Motoneurone durch zwei voneinander unabhängige Zählende ermittelt.

Bei den sensomotorischen Analysen wurde auch auf Verhaltensauffälligkeiten (Lähmungserscheinungen, Muskelschwäche, Reflexverluste etc.) geachtet, um möglichst früh motorische Defizite und andere Tau-pathologische Veränderungen zu erkennen.

3. 2 Versuchstiere

Zur Untersuchung, ob sich eine Tau-Immunisierung positiv auf die motorische Leistung auswirkt, wurde der Tierversuch gewählt, schließlich ist eine Immunisierung nur im lebenden Organismus möglich und die anschließenden Verhaltenstests lassen sich ebenfalls nur an lebenden Tieren darstellen. Die zum Tierversuch zählenden Verhaltensversuche und der Immunisierungsprozess nach A26-11 wurden durch die Tierschutzkommission genehmigt und unter der Aufsicht des Versuchsleiters durchgeführt.

Für diese Studie wurden 35 weibliche C57BL/6 Mäuse, die transgen für das humane 0N4R-Tau-Protein mit der Prolin-301-Leucin-Mutation (P301L) sind, im MEZ/Universität Leipzig gezüchtet. C57BL/6 Mäuse, auch „black 6“ genannt, ist eine der am meist genutzten Inzuchtlinien und zeichnet sich dadurch aus, dass sie bei der Mehrheit der Transgene eine maximale Expression erlaubt. (National Human Genome Research Institute 2014). Die P301L-Mutation des humanen Tau-Proteins liegt in Exon 10 des *microtubule-associated protein tau* (MAPT)-Gens, welches im Menschen auf Chromosom 17 lokalisiert ist. Die Expression der mutierten

MAPT-cDNA führt zu einer zeitigen Tau-Aggregation mit NFT-Bildung und einer frühen Neurodegeneration (auch auf Rückenmarksebene). Motorische Funktionsstörungen können so bereits im Mausealter von 6 Monaten auftreten. Mutationen im MAPT-Gen sind ein Schlüsselmerkmal in der Pathogenese der erblichen sogenannten *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to Chromosom 17* (FTDP17) (Lewis et al. 2000). Mauslinien, die humanes Tau-Protein mit einer FTDP-17-Mutation exprimieren, sind die einzig verfügbaren Tiermodelle mit einer Tauopathie. Obwohl bei der AD keine Mutation im Tau-Gen bekannt ist, werden diese Tiermodelle aufgrund ihrer ähnlichen Tau-Pathologie weltweit genutzt.

Zur Generierung der hier verwendeten Mäuselinie wurden Männchen, die homozygot für die humane cDNA (JNPL3-Mäuse, 0N4R-Isoform, P301L-Mutation) (Lewis et al. 2000) sind, mit Weibchen, die homozygot für den knock-out des murinen Tau-Gens sind (Mapt tm1 (EGFP) Klt) (The Jackson laboratory 2014; Tucker et al. 2001), gepaart. Die F2-Generation wurde anschließend durch PCR auf die Abwesenheit des murinen Tau-Gens und die Anwesenheit der humanen Tau-cDNA genotypisiert. Es fand eine erneute Verkreuzung positiv getesteter F2-Tiere und erneute Genotypisierung der F3-Generation statt. Für die Untersuchungen wurden weibliche Tiere im Alter von 2-4 Monaten und einem Gewicht von 20-30 g verwendet.

Die mit der Tau-Aggregation verbundene und daraus resultierende Degeneration der Motoneurone führt zu einer progressiven Hinterbeinlähmung der Tiere, welche im Rotarod-Test quantifizierbar ist. Eine Verminderung der Tau-Aggregation und -Ausbreitung durch Immunisierung sollte den Funktionsverlust der Motoneurone reduzieren. Dies kann anhand der verzögerten Verschlechterung der immunisierten Tiere auf dem Rotarod gemessen werden. Zu Beginn der Trials waren die Mäuse zwischen zwei und vier Monaten alt und wurden zu viert bis maximal zu fünf gruppengemischt in Käfigen gehalten. Sie hatten jederzeit Zugang zu Essen und Wasser. Spielzeuge oder Laufräder befanden sich jedoch nicht in den Käfigen, um die Ergebnisse der motorischen Tests nicht zu verfälschen. Die Tiere wurden nach dem ersten Rotarod-Trial in drei Gruppen aufgeteilt, so dass in jeder Gruppe der Durchschnitt der Verweildauer auf dem Apparat gleich war, also die anfänglichen Bedingungen für alle drei Gruppen identisch waren. Die Gruppen wurden anschließend wie folgt behandelt:

Gruppe T (13 Tiere): Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Protein-Fragmenten mit CFA

Gruppe M (12 Tiere): Immunisierung ohne weiteres Antigen mit kompletten *Freunds Adjuvans* (CFA) (Adjuvans-Kontrolle)

Gruppe K (12 Tiere): keine Immunisierung (Kontrollgruppe).

Tabelle 3.1 Darstellung aller Versuchstiere mit Alter zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung, sowie Zuordnung zur entsprechenden Versuchsgruppe

Tier	Gruppe	Alter in T	Tier	Gruppe	Alter in T	Tier	Gruppe	Alter in T
13	K	176	2	M	176	3	T	176
18	K	175	19	M	175	17	T	175
21	K	175	22	M	175	20	T	175
32	K	169	23	M	175	40	T	169
33	K	169	39	M	169	47	T	168
45	K	168	46	M	168	48	T	168
54	K	155	67	M	142	53	T	155
68	K	142	70	M	142	69	T	142
82	K	136	83	M	128	71	T	139
85	K	128	88	M	126	81	T	136
119	K	113	120	M	113	84	T	128
120	K	113	123	M	113	89	T	126
						121	T	113
	MW	151,6		MW	150,2		MW	151,5
	SD	23,2		SD	24,4		SD	21

K = Kontrolle, M= Mock-Gruppe, T = Tau-Gruppe

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Um möglichst alle Tiere gleich zu behandeln und mögliche Artefakte innerhalb der Verhaltenstests so gering wie möglich zu halten, wurde Gruppe K mit einer Kanüle ohne Injektion intraperitoneal behandelt.

Die Tiere wurden erst nach einem Training, sowie einem ersten Rotarod-Test (Trial 0) immunisiert, um die motorische Leistung der einzelnen Gruppen zu Beginn der Versuche einschätzen zu können und die Tiere so auf die Versuchsgruppe zu verteilen, dass alle Gruppen die gleichen Ausgangsbedingungen aufweisen.

Um Störfaktoren so gering wie möglich zu halten, wurden alle Tests in einem separaten ruhigen, abgedunkelten Raum (Temperatur: 22 °C) durchgeführt und eine konstante Raumaufteilung über die Versuchsdauer beibehalten. Die Mäuse erhielten vor Beginn eines jeden Versuchs eine 30 minütige Adaptationsphase an den

Testraum. Die Versuche wurden von ausschließlich einem Experimentator zur jeweils gleichen Tageszeit (zwischen 8:00 und 12:00 Uhr) durchgeführt. Da Mäuse nachtaktiv sind, wurde der Versuchsraum stark abgedunkelt und die Versuche ausschließlich unter dem roten Licht einer einzigen Lampe durchgeführt.

Nach dem letzten Trial wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und anschließend Blut für biochemische und Proben von Gehirn und Rückenmark für histologische Untersuchungen entnommen.

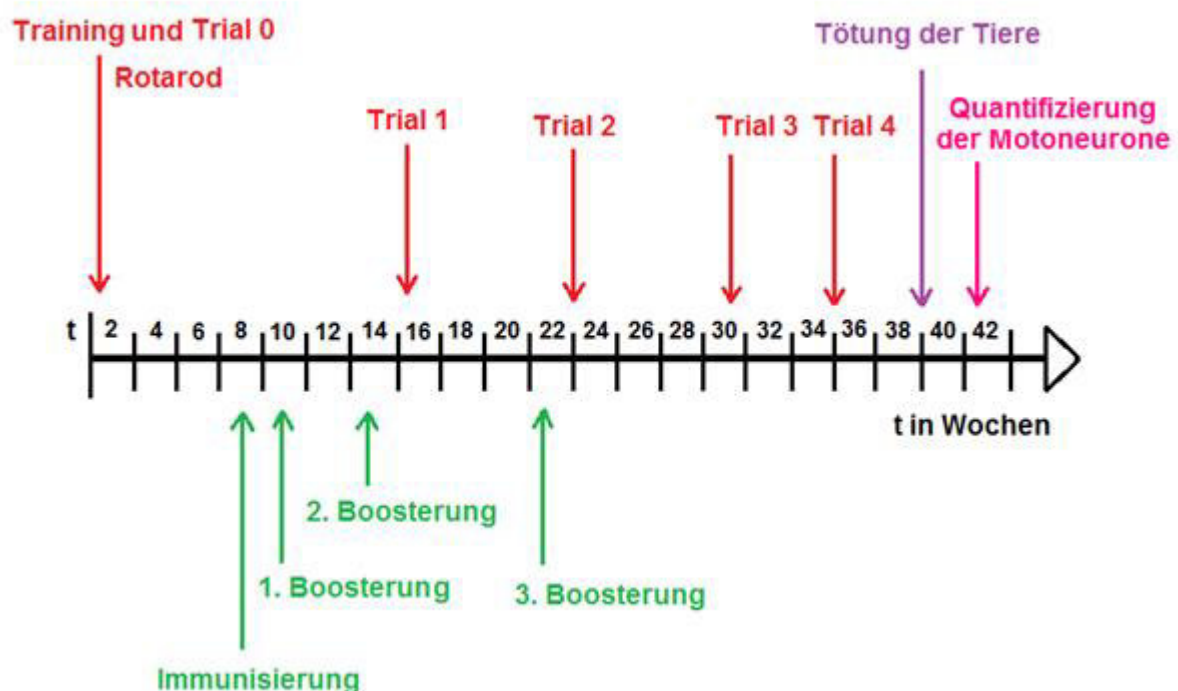


Abbildung 3.1 Zeitstrahl zum Versuchsverlauf

Dargestellt sind sämtliche Testungen vor und nach der Behandlung, sowie die Zeitpunkte der Immunisierung, bzw. Boosterung und der Tötungszeitpunkt der Versuchstiere.

Zwischen dem ersten und dem zweiten Trial verstarben drei Tiere (je eins pro Gruppe) aus unbekannten Gründen.

3. 3 Prozess der Immunisierung

Nach dem ersten Trial wurden die Tiere durch Dr. Max Holzer entsprechend ihrer Gruppeneinteilung behandelt. Hierzu wurde den Versuchstieren der Mock, bzw. der Tau-Gruppe eine subkutane Injektion von je 50 µl einmal im Nackenfell und intraperitoneal gegeben. Die Injektion der Mock-Gruppe bestand aus kompletten *Freunds Adjuvans* (CFA) ohne Tau-Proteinfragmente. Die Tau-Versuchstiere

erhielten CFA mit Tau-Proteinfragmenten. Die Kontrollgruppe wurde ohne Injektion in die entsprechenden Stellen mit einer Kanüle gepiekt (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2 Bestandteile der verschiedenen Injektionsgemische entsprechend der drei Versuchsgruppen

	Freundsches Adjuvans	10 x PBS (steril)	Wasser (steril)	Tau-Fragmente (Endotoxin-arm)
Tau-Gruppe	900 µl	180 µl	220 µl	250 µl F203+ 250 µl F364+
Mock-Gruppe	900 µl	180 µl	720 µl	0
Kontrolle	0	0	0	0

Die einzelnen Elemente wurden gemischt und jeweils 50 µl den Tieren der Tau-, bzw. Mock-Gruppe in Nackenfell und intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppe wurde nur gepiekt ohne Injektion.

CFA enthält abgetötete Tuberkulosebakterien, die als Superantigene das Immunsystem auf das ko-applizierte Antigen Tau aufmerksam machen sollen. Die darauffolgenden Boosterungen wurden mit inkompletten *Freunds Adjuvans* (ICFA) durchgeführt. Dieses enthält nur noch Mineralöl als Depot für das Antigen und Dianhydro-D-mannitolmonooleate als Lösungsvermittler, um eine gute Öl-Wasser-Emulsion zu gewährleisten. Die Tiere der Tau-Gruppe wurden mit CFA inklusive eines Gemisches aus zwei pseudophosphorylierten Tau-Fragmenten behandelt. Ein Fragment enthielt die Aminosäuren 203-387 (F203+), und das andere die Aminosäuren 364-441 der humanen Tau-Variante (F364+). Beim Verfahren der Pseudophosphorylierung werden Aminosäuren ausgetauscht (hier Serin, bzw. Threonin gegen Glutamat), um eine Art Phosphorylierungsmimikry zu erzeugen. Dabei erhalten die Aminosäureseitenketten eine negative Ladung, die der Phosphorylierung ähnelt (Abb. 3.2). Diese können nicht durch Phosphatasen entfernt werden und erhöhen somit die Immunogenität des Tau-Proteins. Sie ähneln dem hyperphosphorylierten Tau-Protein, welches intrazellulär aggregiert.

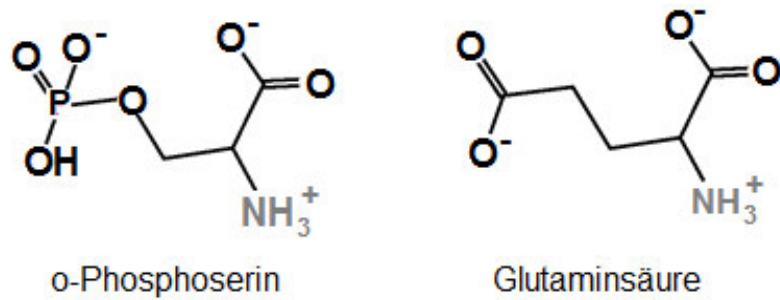


Abbildung 3.2 Pseudophosphorylierung des Tauproteins

Hier dargestellt am Beispiel von o-Phosphoserin als phosphorylierter Teil von Tau und Glutaminsäure als pseudophosphorylierte Aminosäure.

Im Fragment 203+, welches aus den Aminosäuren 203-387 besteht, wurden Ser208, Ser210, Thr212 und Ser214 durch Mutagenese pseudophosphoryliert. Im Fragment 364+, bestehend aus den Aminosäuren 364-441, wurden Ser409, Ser412 und Ser413 pseudophosphoryliert (Abb. 3.3).

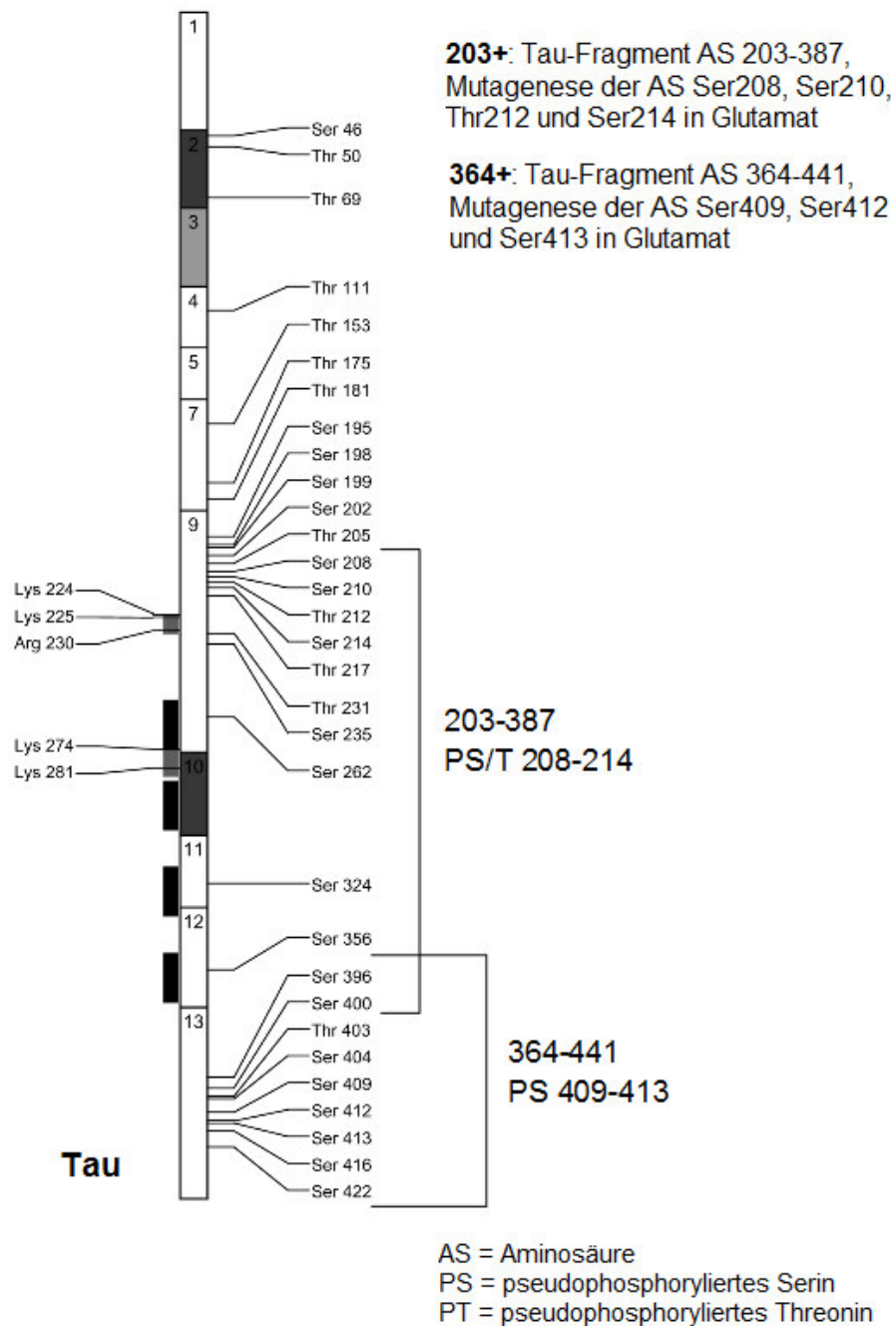


Abbildung 3.3 Darstellung von Tau und den in dieser Studie verwendeten Tau-Fragmenten und deren pseudophosphorylierten Aminosäuren

Die Tiere der Mock-Gruppe erhielten lediglich eine erste Grundimmunisierung mit CFA, ohne Tau-Fragmente und zur anschließenden Boosterung antigenfreies ICFA. Ihre Behandlung sollte eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems bewirken. Wie bereits erwähnt, wurden die Tiere der Gruppe K nur mit einer Kanüle in die entsprechenden Stellen ohne Injektion gestochen, um eine ähnliche Behandlung (Schmerzreiz) in allen drei Gruppen zu gewährleisten. Da Schmerzreize

Stressfaktoren für die Tiere sind, können sie die Ergebnisse der Verhaltensversuche verfälschen.

Die Grundimmunisierung erfolgte in der 8. Test-Woche nach Abb. 3.1, die drei anschließenden Boosterungen erfolgten in Woche 10, 14 und 22.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere getötet und ihr Antikörpertiter unmittelbar nach der Tötung im Blut (6-7 Monate nach der ersten Immunisierung) bestimmt.

3. 4 Rotarod

Der Rotarod-Test wurde erstmalig von Dunham und Miya et al. 1957 beschrieben. Mit ihm sollen Motorik und Balancefähigkeit untersucht werden (DUNHAM und MIYA 1957). Der Rotarod-Apparat (Abb. 3.4) besteht aus fünf, kleinen, durch Plastikwände abgetrennten Kammern, durch die sich quer eine rotierende Walze zieht. Diese kann in bestimmten Zeitabständen ihre Drehgeschwindigkeit (angegeben in Umdrehungen pro Minute, rpm) beschleunigen. Auf diese Walze werden die Mäuse gesetzt und versuchen durch schnelles Laufen und ausbalancieren nicht von ihr herunterzufallen. Eine Lichtschranke am Boden der einzelnen Kammern gibt sofort Signal, sobald ein Tier die Lichtschranke durch Herunterfallen unterbricht. Der Rotarod-Apparat ist mit einem Computer verbunden, der Zeiten, Geschwindigkeit und Versuchsabbrüche selbstständig misst und vermerkt. Im Falle des Herunterfallens von der Walze, hält der Apparat automatisch die Stoppuhr an und speichert die gemessene Zeit.



Abbildung 3.4 Darstellung des Rotarod-Apparats

Um die noch sehr jungen Tiere an den Rotarod-Apparat und dessen Geräusche zu gewöhnen, durchliefen die Tiere ein dreiteiliges Training: Zunächst liefen sie zweimal zehn Sekunden bei einer konstanten Geschwindigkeit von 5 rpm auf der Walze. Da die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch sehr jung waren und weder Apparat noch Versuchsleiter gewöhnt waren, wurde ihnen zur Unterstützung der Balance das hintere Ende des Schwanzes gehalten. Beim zweiten Training mussten die Tiere sich allein auf dem Rotarod halten. Unterstützung durch Halten am Schwanzende entfiel. Die Tiere liefen dreimal 120 sek bei einer konstanten Geschwindigkeit von 5 rpm. Tiere die öfter als viermal von der Walze fielen, wurden vor Ablauf der 120 sek zurück in den Käfig gebracht und ihre erreichte Zeit notiert. Während des dritten Trainings liefen die Tiere wiederholt dreimal bei konstanter Geschwindigkeit (5 rpm) 120 sek lang. Diesmal wurde die Häufigkeit gezählt, in der die Tiere von der Walze fielen. Innerhalb jeder der drei Trainingseinheiten hatte jedes Tier zwischen den Läufen jeweils eine Pause von zehn Minuten.

Im ersten Trial waren die Tiere noch unbehandelt (als Trial 0 aufgeführt). Hierbei liefen sie bei steigender Geschwindigkeit (5-40 rpm) dreimal bis zu maximal 180 sek auf der Walze. Der Zeitpunkt, zu dem sie von der Walze fielen, wurde notiert. Zwischen den Läufen hatten die Tiere auch hier wieder eine Pause von 10 Minuten. Anhand des Trainings und des Trials 0 konnten die Tiere nach ihrer Leistung auf dem Rotarod auf drei Gruppen homogen aufgeteilt werden, so dass für alle drei

Kollektive die gleichen Ausgangsbedingungen herrschten. Anschließend wurden die Tiere ihrer Gruppenzuordnung entsprechend immunisiert. bzw. nur gestochen. Die folgenden vier Trials, die schematisch genauso aufgebaut waren, wie der erste, wurden immer im Abstand von sechs Wochen verblindet durchgeführt.

Die Tests wurden in einem Geräusch reduzierten, abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Tiere vollzogen die Trials käfigweise. In den Käfigen befanden sie sich, wie bereits erwähnt, nach den verschiedenen Behandlungsgruppen gemischt, so dass nicht ersichtlich war, welcher Versuchsgruppe das zu testende Tier angehörte. Nach jedem Wechsel wurde der Rotarod-Apparat mit 10% Isopropanol gereinigt und Luft getrocknet. Die Messungen fanden immer morgens ab 8:30 Uhr statt und die Tiere wurden immer in der gleichen Reihenfolge gemessen.

Da nicht alle Tiere an einem Vormittag getestet werden konnten, wurden sie in zwei Gruppen auf zwei aufeinander folgende Tage aufgeteilt. Jedes Tier lief pro Trial dreimal an drei nicht aufeinander folgenden Tagen auf dem Rotarod (insgesamt neun Werte pro Trial für jedes Tier).

3. 5 Quantifizierung der alpha-Motoneurone

Bei der P301L-Maus kommt es, aufgrund der transgenen Expression und der Spezifität des Motor-Prion-Protein-Promoters, früh zu einer, für die AD typischen Neurodegeneration, die auch auf Rückenmarksebene stattfindet und damit zu entsprechenden motorischen Defiziten der Extremitäten (zunächst v. a. der hinteren) führt. Um zu überprüfen, ob eine spezifische aktive Immunisierung gegen Tau den Prozess der Neurodegeneration bremst, wurde eine Quantifizierung der α -Motoneurone im Rückenmark durchgeführt. Ebenso ist sie erforderlich, um die Beobachtungen in den vorangegangenen motorischen Experimenten mit den entsprechenden funktionellen Veränderungen auf Rückenmarksebene zu vergleichen. Zu erwarten wäre eine Degeneration, bzw. Verlust der α -Motoneurone, bei den Tieren, die schwache motorische Ergebnisse in den vorangegangenen Tests absolviert hatten.

Nach den letzten motorischen Tests wurden die Tiere mit CO₂ betäubt und mit 60 ml 0,15 M NaCl und 60 ml 4% Paraformaldehyd mit 0,1%iger Glutaraldehyd-Lösung transkardial perfundiert. Unmittelbar nach der Perfusion wurde eine Blutprobe entnommen und anschließend das Rückenmark entfernt und auf Höhe des 11. Thorakalwirbels (Th11) geteilt. Um eine postmortale Veränderung des Gewebes zu verhindern, wurden diese sofort mit einer 4%ige phosphatgepufferte

Formaldehydlösung nachfixiert. Die Präparate wurden dann für 24 Stunden bei 4 °C in der Fixierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kryoprotektion in einer 30%igen Saccharose für 24h. Die Quantifizierung der α -Motoneurone wurde nicht an allen Rückenmarksquerschnitten aller Tiere durchgeführt, da eine Stichprobe repräsentativ genug erschien und der Arbeitsaufwand zu groß gewesen wäre. Letztendlich konnte ein verkleinertes Abbild der Grundgesamtheit dargestellt werden, bei größerer Genauigkeit der einzelnen Messungen. Demzufolge wurden aus jeder der drei Gruppen fünf (Kontrollgruppe), bzw. sechs (Mock-/Tau-immunisierte Gruppe) Tiere per Zufall ausgewählt und nur deren Rückenmarksschnitte ausgewertet. Das Rückenmark wurde zwischen dem Abgang des ersten lumbalen Spinalnerven (Höhe L1/L2) und 12 mm kranial dieser Stelle (ca. Th12) gestückelt. Diese Abschnitte wurden mit Saccharose auf dem Blockträger eines Schlittenmikrotoms bei -20 °C festgefroren und mehrere 15 μ m dicke Gefrierschnitte in Frontalebene von rostral her angefertigt. Von diesen Schnitten wurde jedes sechste Präparat auf einen Objektträger gebracht und nach Nissl gefärbt. Bei der Nissl-Färbung werden mit Hilfe von Farbstoffen wie Kresylviolett, Toluidinblau oder Thionin basophile Verbindungen wie RNA und DNA in den Nukleoli und Ribosomen blau oder violett gefärbt. Die Färbung ist besonders zur Darstellung von Nervengewebe geeignet. Insgesamt ergaben sich so 12-26 Schnitte pro Tier. Die übrigen Schnitte wurden in Mikrotiterplatten aufbewahrt.

Von den einzelnen nach Nissl gefärbten Schnitten auf den Objektträgern wurden mit einer *Carl Zeiss AxioCam* Mikroskopkamera mit einem 20er Objektiv einzelne digitale Bilder aufgenommen und jedes zu einem Bild mittels der Stitching Funktion des *AxioVision-Software* zusammengesetzt.

Da nicht mit absoluter Exaktheit bei jeder Rückenmarksprobe die gleiche Höhe wie beim vorhergehenden Tier getroffen werden konnte, ergaben sich für jedes Tier unterschiedlich viele Schnitte (insgesamt zwischen 12-26 \rightarrow entspricht etwa 1,3 mm). Um Störfaktoren/Artefakte möglichst gering zu halten und um die Auswertung zu vereinfachen, wurden nur acht aufeinanderfolgende Schnitte pro Tier ausgewählt. Sonstige übrig gebliebene Schnitte wurden ebenfalls verworfen.

In der grauen Substanz der Rückenmarksquerschnitte wurde mit *AxioVision* die Grenze von Hinter- und Vorderhorn durch eine Linie unterhalb des Zentralkanals festgelegt und anschließend, um die bestmögliche Vergleichbarkeit zu sichern, wurde je ein Quadrat von 250 x 250 μ m gezogen und dieses so zentral wie möglich in das

linke und rechte Vorderhorn platziert (Abb. 3.5). Innerhalb dieses Kästchens wurde manuell der Durchmesser jedes α -Motoneurons bestimmt (Abb. 3.6). Um wirklich nur α -Motoneurone zu messen, wurden nur Zellen als α -Motoneurone identifiziert, die eine Mindestdurchmesser von 10 μm hatten und folgende äußerliche Merkmale erfüllten: Der Nucleus der Zelle musste erkennbar sein und es musste wenigstens ein abgehender Dendrit zu identifizieren sein (Abb. 3.7).

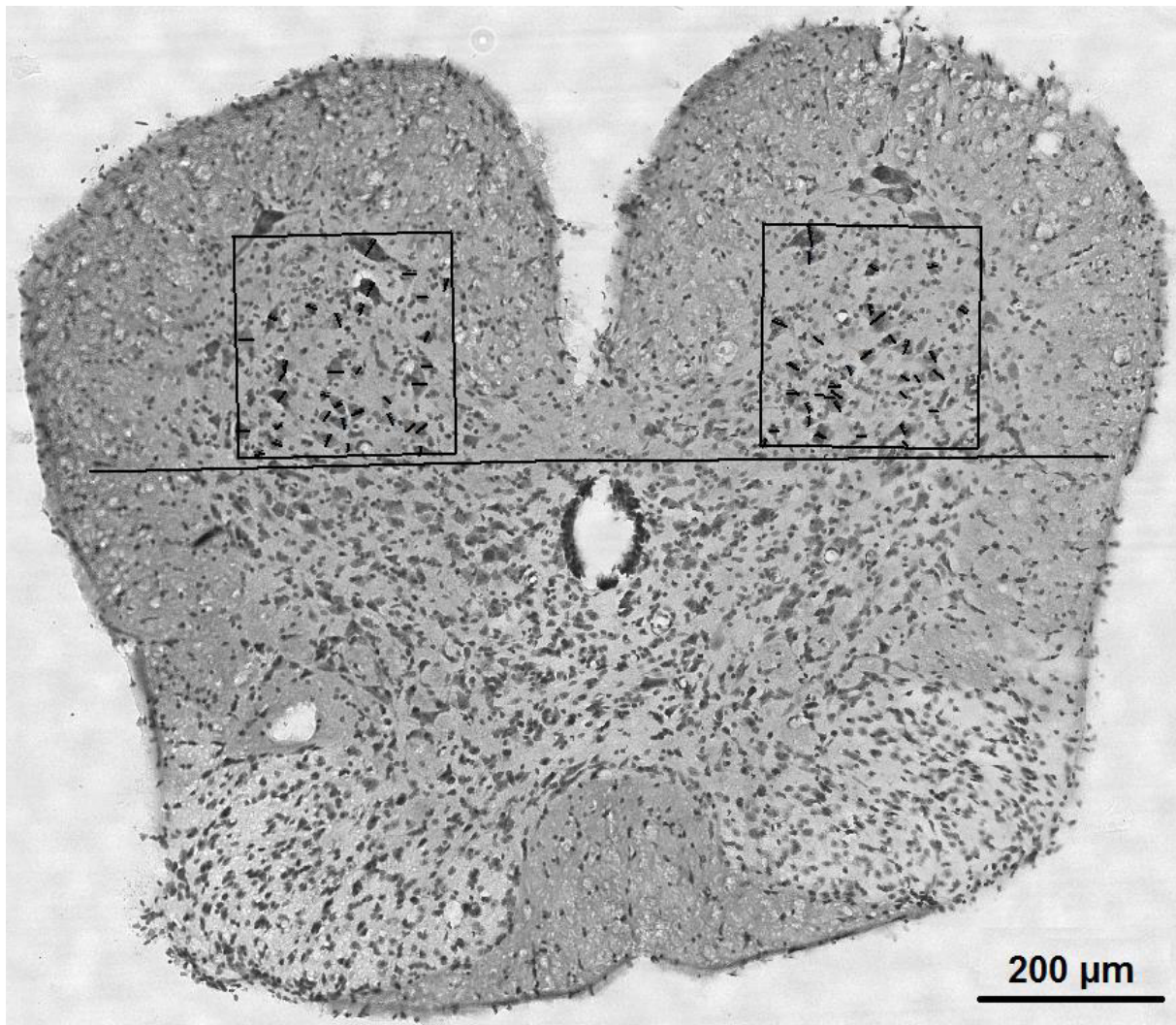


Abbildung 3.5 Darstellung des Rückenmarksschnitts eines Versuchstieres

Eingezeichnet sind die Grenze des Vorderhorns unterhalb des Zentralkanals und zwei 250 x 250 μm große Quadrate, innerhalb dessen alle α -Motoneurone mit einem Durchmesser über 10 μm markiert wurden. Färbung nach Nissl.

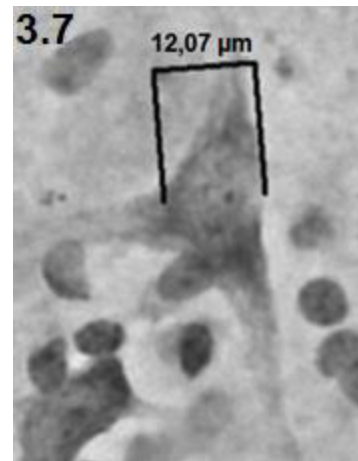
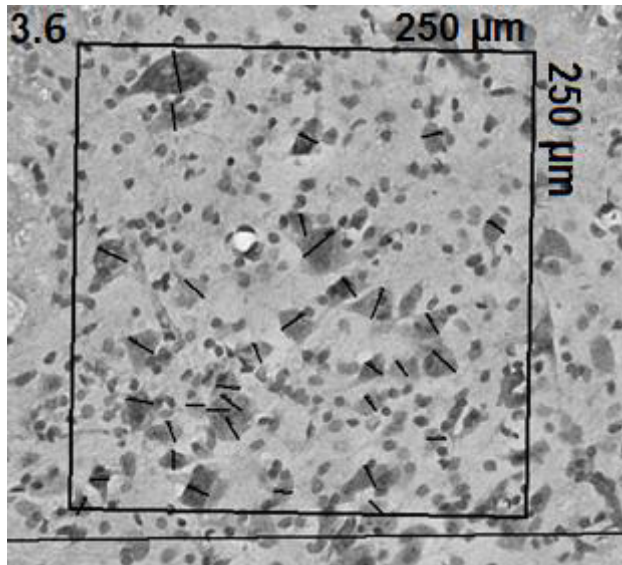


Abbildung 3.6 Darstellung der Meßregion (250 x 250 µm) im Vorderhorn des Rückenmarks der Versuchstiere, in welchem der Durchmesser aller α -Motoneurone größer als 10 µm markiert wurde

Abbildung 3.7 Darstellung eines α -Motoneurons im Vorderhorn des Rückenmarks eines Versuchstieres

Es zeigt die Merkmale, die es bei der Identifizierung eines α -Motoneurons zu beachten gilt: Mindestgröße von 10 µm, Nucleus erkennbar und mindestens ein abgehender Dendrit.

Färbung nach Nissl.

In wenigen Schnitten war eine Seite der Vorderhörner beschädigt und demzufolge die α -Motoneurone nicht mehr vollständig vorhanden. Dies war entweder auf Quetschungen oder Abschürfungen während des Herauspräparierens des Rückenmarks oder auf Läsionen, die beim Gefrieren oder Mikrotomieren entstehen, zurückzuführen. In diesen Fällen wurde nur die unversehrte Hälfte gezählt und bei der Auswertung deren Wert verdoppelt. Um eine möglichst hohe Reliabilität zu gewährleisten, wurden die Objektträger zweimal von zwei unabhängigen Zählenden verblindet ausgewertet, durch mich und anschließend zusätzlich von Frau Dr. Gudrun Seeger.

3. 6 Verhaltensbeobachtungen während der Tests

Vor jedem Rotarod-Test wurden alle Tiere auf verschiedene, im Zuge der Tauopathie möglicherweise auftretende Veränderungen hin untersucht.

Zunächst wurden die Tiere einzeln betrachtet und, wenn vorhanden, Veränderungen von Fell (Fellverluste, Kratzspuren), Körperhaltung (Kyphose), Augen (Lidschluss

und -öffnung), Genitale und Rektum (Verunreinigungen) notiert. Auffälligkeiten in diesen Bereichen würden auf mangelnde Fähigkeit zur Selbstversorgung und damit zu einem stark fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung hinweisen.

Während der Pausen konnten die Tiere in ihren Käfigen beobachtet werden und gegebenenfalls Auffälligkeiten protokolliert werden. Hierzu gehörte das Nestbauverhalten. Die Tiere hatten mehrere Zellstofftücher in ihren Käfigen mit denen sie im Allgemeinen gerne kleine Nester bauten. Die Nester wurden nach Aussehen und Sauberkeit im Käfig untersucht. Mangelnde Sauberkeit wäre auch hier wieder ein Indiz für zunehmenden geistigen und körperlichen Abbau.

Ebenfalls wurde auf ungewöhnliche Bewegungen, wie Kopfschütteln, Rückwärts- oder im Kreislaufen, v. a. plötzliche Handlungen, wie blitzartiges Rennen oder kräftiges Kratzen, geachtet, die gleichfalls als pathologisch entsprechend der Erkrankung gedeutet wurden.

Während des Handlings innerhalb der Experimente wurden die Tiere auf Anzeichen von Nervosität oder Ängstlichkeit beurteilt. Diese äußerten sich z. B. in Lautgeben oder in Erstarren mit zusammengekniffenen Augen. Ängstlichkeit oder Nervosität können als Symptom der Tauopathie vermehrt auftreten (Crawley 2007).

Kurz vor jedem Experiment wurden zusätzlich die Hinterbeinreflexe jedes Tieres beim Hochheben getestet. Diese wurden als gesund befunden, wenn sich die Hinterbeine beim Anheben ruckartig spreizen. Wenn sich die Hinterbeine aber kaum bewegen oder gar zusammenzogen (Abb. 3.8), wurde diese Beobachtung als pathologisch gewertet. Verminderung oder gar Fehlen der Reflexe ist ein Indiz für einen bereits vorangeschrittenen Prozess der Muskeldegeneration (Crawley 2007). Am Zeitpunkt zu starker degenerativer Veränderungen bei mehr als drei Tieren, unbedeutend welcher Gruppe, wurden die Versuche abgebrochen. Diese Bedingung war zum Zeitpunkt des letzten Rotarod-Trials erfüllt.



Abbildung 3.8 pathologischer Reflex der Hinterbeine bei der P301L-Mutation

3. 7 Gewicht

Um den körperlichen Zustand der Tiere und auch deren Entwicklung während der Trials abwägen zu können, wurden regelmäßig Gewichtskontrollen durchgeführt. Gewichtsabnahmen wurden als Anhaltspunkt für unzureichende Selbstversorgung betrachtet (Tier kann sich z. B. nicht ausreichend aufrichten oder nur schlecht gehen und gelangt nicht ans Futter). Plötzliche Gewichtszunahmen wurden als Hinweis auf Erkrankungen, wie z. B. Aszites interpretiert.

Die Tiere wurden meistens nach den Rotarod-Messungen gewogen. Dafür wurde eine kleine mit Zellstoff ausgelegte Styroporbox auf die Waage gestellt und diese geeicht. Anschließend wurde das zu messende Tier in die Box gesetzt. Da die Wände der Box relativ hoch waren, konnten die Tiere nicht aus der Box flüchten. Das Zellstoffpapier bot den Tieren außerdem Unterschlupf, in dem sie meist still saßen. Das Gewicht der Tiere wurde zweimal bestimmt und der Durchschnitt der beiden Werte notiert.

3. 8 Statistische Analyse

Um Zufallsergebnisse zu verhindern, wurde jede Messung mehrfach durchgeführt. Für alle Bestimmungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD), sowie die Anzahl der Versuche angegeben.

Die graphische Darstellung erfolgte mit *GraphPad Prism* Version 6.0 vom August 2012 (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Die statistischen Analysen wurden mit *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism* durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde *One-Way-Analysis-of-Variance* (*Oneway-Anova*) verwendet. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut, um drei Gruppen hinsichtlich eines Messwertes zu vergleichen. Das Signifikanzniveau wurde nach Fisher-Korrektur (*Fisher's LSD*) für alle Messungen bei $p \leq 0,05$ festgelegt. Demzufolge wurden alle Unterschiede mit einem $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Alle Signifikanzberechnungen wurden ebenfalls noch mit dem gepaarten T-Test kalkuliert. Dazu wurde die Rotarod-Verweilzeit eines jeden Tieres aus jeder Gruppe vor der Immunisierung mit der Verweilzeit im letzten Trial verglichen. Dabei wurden die Ergebnisse der *One-Way-Anova* bestätigt. Auf die Darstellung der Berechnungen aus dem gepaarten T-Test wurde verzichtet.

Um eine statistisch gesicherte Aussage über den Wert des Zusammenhangs von Verweilzeit auf dem Rotarod und Anzahl der Motoneurone zu machen, wurde der Korrelationskoeffizient r der beiden Merkmale berechnet, sowie der t-Test und die Prüfgröße zur Überprüfung dieses Koeffizienten ermittelt (Faes 2014).

4 Ergebnisse

4. 1 Rotarod

Die Untersuchung der sensorimotorischen Leistung und der Balancefähigkeit fand durch die Messung der Verweilzeit auf dem Rotarod statt. Je länger ein Tier auf der sich drehenden Walze bei zunehmender Geschwindigkeit bleiben konnte, desto besser wurden seine motorischen Fähigkeiten eingeschätzt.

Zunächst durchliefen die Tiere ein Training, um sich an den Rotarod-Apparat und dessen Geräusche, sowie an den Testablauf selbst zu gewöhnen. Danach erfolgte eine Leistungseinschätzung im Trial 0 vor der Immunisierung. Anschließend wurden die Tiere in drei gleich starke Gruppen aufgeteilt und je nach ihrer Gruppenzugehörigkeit behandelt (Tau-Immunisierung, Mock-Immunisierung oder gar keine Behandlung). Verteilt wurden sie anhand ihrer Rotarod-Ergebnisse, ihres Gewichtes und ihres Lebensalters, so dass der Mittelwert dieser Parameter gleich war und die Gruppen möglichst homogen in ihren Ausgangsbedingungen waren. Es fanden nun insgesamt vier Trials immer im Abstand von sechs Wochen statt. In diesen wurde die Verweildauer der Tiere drei Mal täglich an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen auf dem Rotarod gemessen. Die Geschwindigkeit begann bei 5 rpm und erreichte ihr Maximum von 40 rpm nach 180 sek. Aus den neun erhaltenen Werten wurde jeweils der Durchschnitt ermittelt und zur weiteren Auswertung verwendet. Alle Trials wurden verblindet durchgeführt.

Die Entwicklung der einzelnen Gruppen verdeutlicht Abbildung 4.1: In Trial 0, dem Zeitpunkt vor der Immunisierung, ist die Verweildauer der Tiere noch relativ gleich, aber nach der entsprechenden Immunisierung zeigt sich im ersten Trial (7 Wochen nach der Immunisierung), dass die Tiere der Tau-Gruppe insgesamt länger auf der Walze verweilen können, als die Tiere der anderen beiden Gruppen (\bar{K} : 48,2 sek, SD = 12,8; \bar{M} : 51,6 sek, SD = 8,8; \bar{T} : 62,5 sek, SD = 21,3). Dieser Unterschied ist zwischen Tau- und Kontrollgruppe signifikant ($p \leq 0,027$), und ebenso zwischen Tau- und Mock-Gruppe ($p \leq 0,047$). Die gleiche Feststellung kann im dritten Trial getroffen werden (23 Wochen nach der Immunisierung). Auch hier zeigt die Tau-Gruppe höhere Verweilzeiten als die Mock- und Kontrollgruppe. Auch dieser Unterschied ist signifikant (zwischen Gruppe K und T: $p \leq 0,019$ und zwischen Gruppe M und T: $p \leq 0,037$). Auch wenn in Trial 2 (15 Wochen nach Immunisierung)

kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu ermitteln ist, zeigt sich dennoch eine Tendenz in den gemessenen Werten, die den Ergebnissen von Trial 1 und 3 entspricht. Die Verweilzeiten der Mock und Kontrollgruppe unterscheiden sich in den ersten drei Testungen kaum voneinander. Im ersten Trial nimmt die Leistung der Mock-immunisierten und der Kontrolltiere im Vergleich zum Training in geringem Maße ab. In den übrigen Trials bleibt die Leistung mit kleineren Schwankungen ungefähr konstant. Nur im letzten Trial zeigt sich in der Mock-Gruppe eine Verbesserung der Leistung, die jedoch nicht signifikant ist.

Was an den Messergebnissen der Tau-Gruppe ebenfalls auffällt, sind die von Trial zu Trial immer etwas ansteigenden Verweilzeiten auf dem Rotarod. Dies könnte auf einen Trainingseffekt zurückgeführt werden, der häufig bei wiederholten Rotarod-Tests auftritt. Eine andere Erklärung wäre, dass die Tiere zu den späteren Testungen älter waren und damit ruhiger und konzentrierter ihre Aufgabe vollzogen. Dieses Phänomen kann teilweise auch in den anderen Gruppen beobachtet werden, tritt aber nicht so durchgehend auf, wie in der Tau-Gruppe.

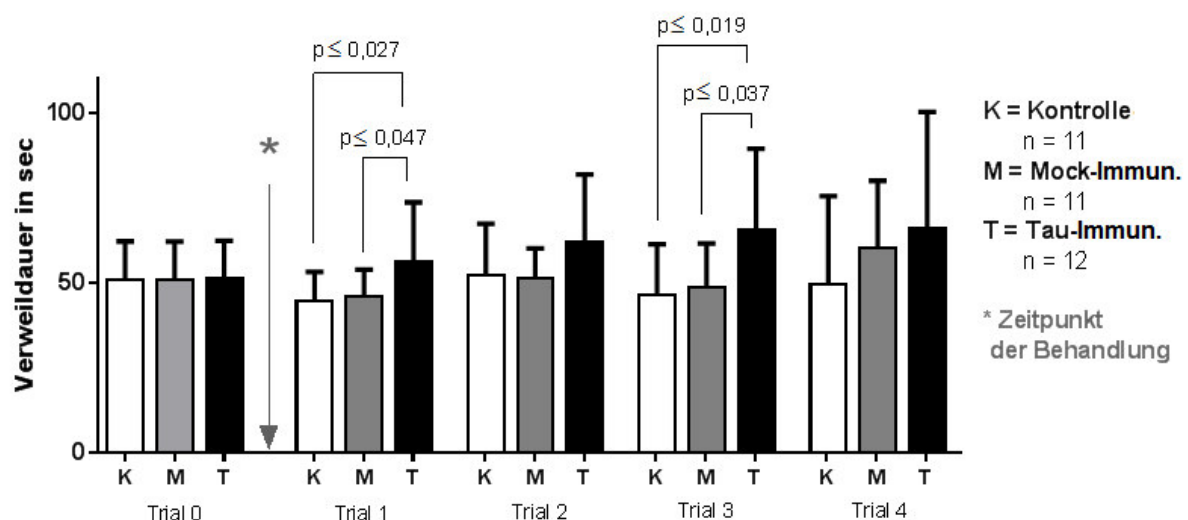


Abbildung 4.1 Ergebnisse des Rotarod-Tests in allen 3 Gruppen vor und nach der Immunisierung

Der Zeitpunkt der Immunisierung wurde mit * gekennzeichnet. In der Kontroll- und in der Mock-Gruppe befanden sich 11 Versuchstiere und in der Tau-Gruppe 12. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tau-immunisierten Tieren und der Kontrollgruppe, sowie zwischen den Mock-Behandelten und den Tau-Immunisierten während des ersten und des dritten Trials. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit OneWay Anova und Fishers LSD.

Folgende Mittelwerte konnten in den einzelnen Gruppen über alle Trials bestimmt werden: Tau: 60,3 sek, Mock: 51,4 sek, Kontrolle: 48,7 sek. Bei näherer Betrachtung

zeigten die Daten, die für die einzelnen Tiere erhoben wurden, eine starke Streuung. Dies zeigt sich in der Spannbreite der einzelnen Versuchsgruppen. In der Gruppe der Tau-Immunisierten lag der größte Messwert bei 98 sek und der kleinste Messwert bei 34,9 sek. Der größte, in der Mock-Gruppe bestimmte Wert lag bei 65,4 sek und der kleinste bei 42,6 sek. In der Kontrollgruppe ergaben sich für den größten Wert 67,9 sek und für den kleinsten 31,1 sek. Besonders hoch war die Streuung im letzten Trial. Dies verdeutlichen auch die weit reichenden Fehlerbalken in Abbildung 4.1: Im ersten Trial ist die Standardabweichung noch gering und in den darauffolgenden nimmt sie immer mehr zu v. a. in der Tau-Gruppe. Ganz besonders ausgeprägt ist die Streuung der Ergebnisse im letzten Trial in allen drei Gruppen. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich keine statistisch relevanten Aussagen mehr zu den einzelnen Gruppen und deren Verhalten treffen. Ursache der starken Streuung könnte die schon ausgeprägte Hinterbeinlähmung sein, die bei einzelnen Individuen zu diesem Zeitpunkt auftrat. Durch ihr physisches Defizit können sie sich nicht so lange auf dem Rotarod halten, wie andere Tiere, deren Lähmung noch nicht so weit fortgeschritten ist.

Eine andere Möglichkeit die Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat zu betrachten bietet Tab. 4.1. Hier wird ein Ranking der mittleren Verweildauer auf dem Rotarod aus allen vier Trials nach der Immunisierung von jedem Tier dargestellt. Zu sehen ist, dass sich vor allem Tau-Immunisierte in den oberen Positionen befinden, die Mock-Immunisierten sind eher in der Mitte zu finden und die Kontrollgruppe nimmt eher Positionen im unteren und zum Teil auch im mittleren Bereich ein. Dies bedeutet, dass die Tau-immunisierten Tiere längere Verweilzeiten auf dem Rotarod haben, die Mock-immunisierten Tiere liegen eher im mittleren Bereich und die Kontrollgruppe mit am kürzesten auf dem Apparat verweilen.

Tabelle 4.1 Rankingtabelle der gemittelten Verweildauer auf dem Rotarod aller einzelnen Versuchstiere in allen vier Trials nach Immunisierung

Rang	Tier	Verweildauer* in sek
1.	71	106,6
2.	47	94
3.	53	73,6
4.	69	72,6
5.	18	70,1
6.	21	69,8
7.	67	65,6
8.	70	65,1
9.	3	63,4
10.	17	58
11.	89	57,6
12.	22	57,5
13.	33	55,1
14.	123	54,5
15.	40	52,1
16.	46	52
17.	122	51,8
18.	121	50,7
19.	88	49,4
20.	2	49,3
21.	83	48,4
22.	48	47,8
23.	32	46,4
24.	82	46,4
25.	19	45,2
26.	54	45,1
27.	39	44,7
28.	45	40,1
29.	119	39,2
30.	84	38,1
31.	23	35,9
32.	20	35,9
33.	68	35,1
34.	85	31,1

Kontrolle
Mock
Tau

*Verweildauer entspricht
dem Mittelwert aller
Rotarod-Messungen nach
Immunisierung (Trial 1-4)

Es zeigt sich, dass vermehrt Tau-immunisierte Tiere (schwarz) die Spitzenpositionen belegen, während Mock-immunisierte (rot) und Kontrolltiere (blau) eher in den mittleren bis unteren Positionen zu finden sind. In der Mock- und Kontrollgruppe befanden sich jeweils 11 Versuchstiere und in der Tau-Gruppe 12.

4. 2 Analyse des Tau-Antikörpertiters

Nach dem letzten Rotarod-Trial (ca. 6-7 Monate nach der Immunisierung) wurden die Tiere getötet und ihr Antikörpertiter gegen das Tau-Protein im Blut bestimmt. Tab. 4.2 zeigt, dass die Tiere der Tau-Gruppe zum Tötungszeitpunkt noch einen hohen Antikörpertiter hatten. Eine ausreichende Immunisierung war bei ihnen also während des gesamten Testungszeitraums gewährleistet. Die anderen beiden Gruppen haben eine sehr niedrige Anti-Tau-Immunoreaktion, die im Bereich des Hintergrundwertes des Immunoassays angesiedelt ist.

Tabelle 4.2 Antikörpertiter gegen das Tau-Protein nach Tötung der Versuchstiere

Gruppe	Titer (Mittelwert)	Std.abweichung
K (n=11)	0,06	0,11
M (n=11)	0,01	0,01
T (n=12)	1,39	0,36

Versuchstier	Gruppe	Titer
3	T	1,15
17	T	1,18
20	T	1,09
40	T	0,78
47	T	1,46
48	T	1,10
53	T	1,31
69	T	1,89
71	T	1,55
81	T	1,93
84	T	1,36
121	T	1,81

Optische Dichte bei 440 nm

Verdünnung Blutserum 1:2000

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Antikörpertiter gegen Tau bei allen 3 Gruppen. Daneben die Titer jedes einzelnen Versuchstieres der Tau-Gruppe. Zu sehen ist, dass alle Tiere der Tau-Gruppe hohe Antikörpertiter haben und die Mock-, bzw. Kontrollgruppe niedrige Titer aufweisen. Titer: optische Dichte bei 440 nm bei einer 1:2000 Verdünnung des Blutserums im Immunoassay (bestimmt im direkten ELISA gegen das Antigengemisch).

4. 3 Quantifizierung der alpha-Motoneurone

Mit dem Programm *AxioVision* der Carl Zeiss Jena GmbH wurden Anzahl und Durchmesser der α -Motoneurone in einem bestimmten Rückenmarksabschnitt (L1/2) der ausgewählten Tiere bestimmt. Dies sollte die Analyse einer möglichen Beziehung zwischen motorischer Leistung und Motoneuronanzahl ermöglichen. Hierzu wurden fünf (Mock- und Kontrollgruppe), bzw. sechs (Tau-Gruppe) Tiere pro Gruppe per

Zufall ausgewählt und deren lumbales Rückenmark in Querschnitte geschnitten. Insgesamt wurden für die Zählungen von jedem ausgewählten Tier acht dieser Querschnitte verwendet und die in einem Quadrat konkreter Größe (250 x 250 μm) enthaltenen α -Motoneurone im Vorderhorn gezählt. Es wurde wieder der Mittelwert dieser acht Zählungen berechnet und für die weitere Auswertung verwendet. Wichtig war hierbei, dass nur Zellen ab 10 μm Durchmesser und mit bestimmten Charakteristika (siehe Material und Methoden) als α -Motoneurone klassifiziert wurden und auch nur dann in die Messung einfließen. Die Zählung wurde unabhängig von zwei Personen (mir und Frau Dr. Gudrun Seeger) verblindet durchgeführt, um eine möglichst hohe Reliabilität zu gewährleisten. Hierbei wurde eine annähernd gleiche Anzahl an α -Motoneuronen pro Versuchstier ermittelt. Tabelle 4.3. verdeutlicht dies, da die Mittelwerte der α -Motoneuronenanzahl in den Vorderhörnern der Tiere in beiden Zählungen von allen 3 Gruppen annähernd gleich sind.

Tabelle 4.3 Ergebnisse der Quantifizierung der α -Motoneurone im Rückenmark der Tiere durch zwei unabhängige Zählende

Gruppe	Tier	Anzahl MN des 1. Zählenden	Anzahl MN des 2. Zählenden
T	20	62	73
	53	73	64
	40	64	67
	47	91	69
	69	70	69
	84	61	59
MW \pm SD		70 \pm 11,2	67 \pm 4,8
M	19	46	57
	39	69	61
	46	64	64
	67	59	63
	70	69	75
	83	72	70
MW \pm SD		63 \pm 9,6	65 \pm 6,5
P	45	63	47
	32	50	50
	68	78	52
	85	35	56
	54	33	53
MW \pm SD		52 \pm 19	52 \pm 3,4

MN = Motoneurone
MW = Mittelwert
SD = Standardabweichung

Die Mittelwerte der α -Motoneuronenanzahl in den Vorderhörnern der Tiere sind in beiden Zählungen von allen 3 Gruppen annähernd gleich

Im Bereich der Verteilung der Zellgröße ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Größenverteilung der α -Motoneurone war für alle Tiere in etwa gleich. Es fiel auf, dass die meisten α -Motoneurone zwischen 10 und 15 μ m groß waren. Größere α -Motoneurone waren in allen drei Gruppen etwa gleich selten. Es ergaben sich aber Unterschiede in der Gesamtzahl der α -Motoneurone. Abbildung 4.2 fasst die ermittelten Ergebnisse der Quantifizierung der α -Motoneurone in Form von Boxplots zusammen. Sie veranschaulicht, dass die Tau-immunisierten Tiere insgesamt die meisten α -Motoneurone im Vergleich zu den anderen Gruppen haben (\bar{T} : 70, SD = 11,2; \bar{M} : 63, SD = 9,6; \bar{K} : 52, SD = 19, alle Angaben bezogen auf gezählte α -Motoneurone in einer Fläche von

250 µm x 250 µm), jedoch ist dieser Unterschied nur signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,04$), nicht aber im Vergleich zur Mock-immunisierten Gruppe ($p \leq 0,38$). Dennoch wurden weniger α -Motoneurone in den Schnitten der Mock-immunisierten Mäuse ermittelt als in der Tau-immunisierten Gruppe, aber immer noch mehr als in der Kontrollgruppe. Es zeigt sich also eine Tendenz der Gruppen zueinander, die sich bereits im Rotarod-Test dargestellt hat.

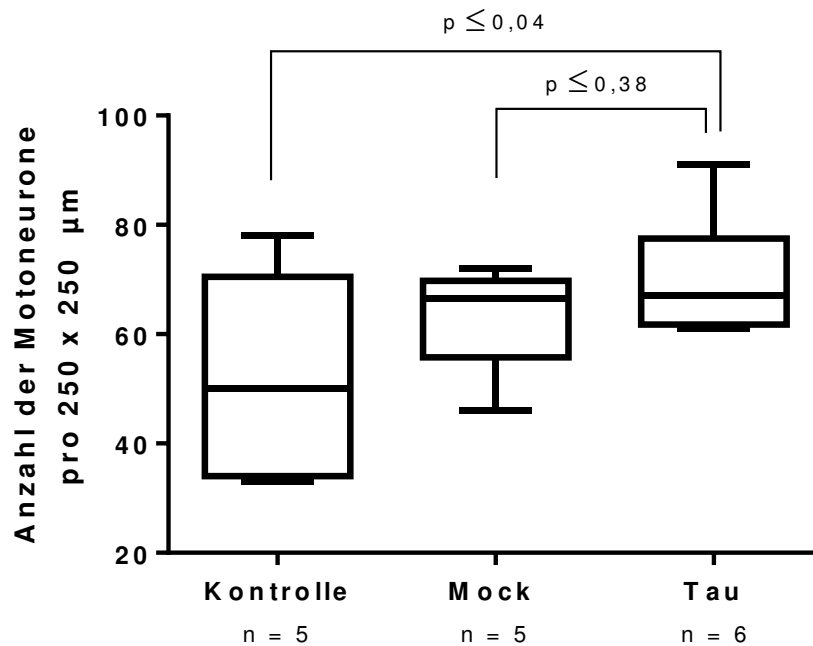


Abbildung 4.2 Quantifizierung der α -Motoneurone in allen 3 Gruppen

In der Kontroll- und in der Mock-Gruppe wurden die Schnitte von 5 Versuchstieren ausgezählt, in der Tau-Gruppe die von 6. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Tau- und der Kontrollgruppe ($p \leq 0,04$), jedoch nicht zwischen Mock- und Tau-, bzw. Kontrollgruppe. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit OneWay Anova und Fishers LSD.

Der Boxplot der Tau-Immunisierten weist eine Rechtsschiefe in der Verteilung der Messdaten auf. Die gesamte Box befindet sich im Bereich einer höheren Anzahl an Motoneuronen. Der Boxplot der Mock-Immunisierten zeigt dagegen eine Linksschiefe. Sein Median liegt im Bereich der höheren Messergebnisse. Der Boxplot der Kontrolle ist zwar symmetrisch, jedoch unterliegen die Werte der nicht immunisierten Tiere einer starken Streuung. Diese Tendenz ließe also vermuten, dass in den Vorderhörnern der Mock-Gruppe zwar mehr α -Motoneurone erhalten geblieben sind als in der Kontrollgruppe, es jedoch zu mehr Verlusten an α -Motoneuronen kam als in der Tau-Gruppe. Diese Vermutung besitzt keine

Signifikanz und kann deswegen nur als Trend, aber nicht als Beweis gedeutet werden.

Außerdem ist es noch wichtig zu untersuchen, ob denn die Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat tatsächlich mit der Anzahl der Motoneurone korreliert. In Abb. 4.3 wurden sämtliche Werte der Quantifizierung der Motoneurone der untersuchten Tiere mit ihren entsprechenden Verweilzeiten auf dem Rotarod-Apparat aller vier Trials nach der Immunisierung gegenübergestellt und deren Korrelation ermittelt. Es zeigt sich eine lineare Korrelation der beiden Variablen. Je mehr Motoneurone im Rückenmark der Versuchstiere erhalten geblieben sind, desto länger konnten sich die Tiere auf dem Rotarod-Apparat halten. Die Aussage des Graphen in Abb. 4.3 wird rechnerisch noch eindeutiger durch Berechnung des Korrelationskoeffizient r . Anhand der ermittelten Daten ergab sich eine Korrelation von $r = 0,6$. Demzufolge kann die Korrelation der beiden zu untersuchenden Messungen als stark, aber nicht sehr stark korrelierend gewertet werden. Über den Korrelationskoeffizienten lässt sich eine Prüfgröße (PG) ermitteln, mit welcher die Signifikanz ($p < 0,05$) bestimmt werden kann, mit der beide Variablen korrelieren. Die für diesen Korrelationskoeffizienten ermittelte PG liegt bei $PG = 2,8$ ($>$ dem entsprechenden t-Wert von 2,12). Damit besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Variablen, d. h. Verweildauer und Motoneuronenanzahl sind voneinander abhängig (Faes 2014).

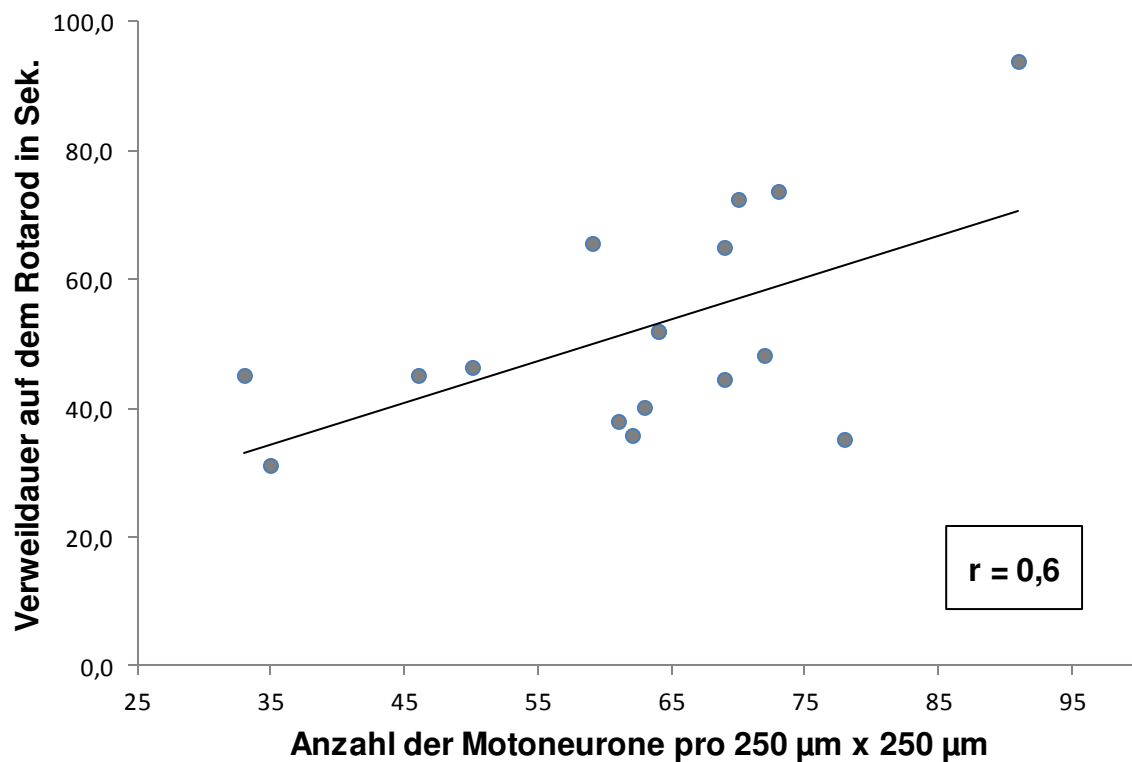


Abbildung 4.3 Korrelation (r) der Anzahl der α -Motoneurone pro 250 μm x 250 μm und der Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat nach dem Zeitpunkt der Immunisierung

Es zeigt sich eine positive Korrelation ($r = 0,6$, $p < 0,05$) der Verweildauer und der Anzahl der Motoneurone. Die beiden Variablen sind also voneinander abhängig. Dies bedeutet umso mehr Motoneurone den Tieren erhalten geblieben sind, desto länger sind sie in der Lage sich auf dem Drehstab zu halten.

5 Diskussion

Neuere Therapieansätze gegen die AD tendieren immer stärker zu Immunisierungsverfahren. Wenige aktive, wie auch passive Impfstoffe gegen pathologische Markerproteine der AD wurden bereits an transgenen Mausmodellsystem getestet. Besonders Antigene mit Phospho-Tau-Epitopen zeigten gute Erfolge im Mausmodell (Asuni et al. 2007; Boimel et al. 2010; Boutajangout et al. 2010). Phospho-Tau-Epitope sind Merkmale eine Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und präsentieren damit eine Eigenschaft der Tau-Aggregate. Ebenso konnten wir in früheren, bisher unveröffentlichten Versuchen zeigen, dass durch eine Immunisierung mit Phospho-Tau-Epitopen und unphosphoryliertem Tau die Immunantwort schwächer ausfällt (niedrigerer Antikörpertiter) als bei einer Immunisierung mit pseudophosphoryliertem Tau. Dabei ergab sich folgende Reihenfolge der Immunogenität der Antigene: die niedrigste Immunogenität wies nichtphosphoryliertes Tau auf, gefolgt von phosphoryliertem Tau-Protein. Die pseudophosphorylierten Tau-Fragmente wiesen eine höhere Immunogenität auf und waren stabiler als Phosphoeptiope. Des Weiteren sind sie hochmolekularer als die Peptidantigene und benötigen dadurch keinen Carrier als Immunstimulator. Deshalb wurde in dieser Studie ein Impfstoff verwendet, der pseudophosphorylierte Tau-Epitope enthält.

Als Mausmodell wurde die Tau-P301L-Maus ausgewählt, da sie frühzeitig eine ausgeprägte Tau-Aggregation aufweist und damit eine starke Neurodegeneration ausbildet. Die P301L-Mutation tritt bei der FTDP-17 auf. Der Unterschied in der Tau-Pathologie des Mausmodells zur Tau-Pathologie des Menschen liegt darin, dass es bei den Mäusen v. a. zu einer ausgeprägten Motoneurondegeneration kommt, dies ist hauptsächlich durch den artifiziellen Maus-Prion-Protein-Promoter bedingt (Lewis et al. 2000).

Zu Beginn der Versuche, also vor der Immunisierung, zeigten die Tiere bereits geringe Unterschiede in ihren motorischen Fähigkeiten, so dass, wie zuvor erwähnt, die Gruppeneinteilung nicht per Zufall erfolgen konnte. Die Tiere wurden gleichmäßig aufgeteilt, damit alle insgesamt etwa die gleiche Verweilzeit zu Beginn der Testung erbrachten. Die Verweilzeit ist definiert als das Vermögen sich auf der sich drehende Walze des Rotarod-Apparates zu halten. Ebenso waren während der gesamten

Trials immer wieder starke Ausreißer zu beobachten. Einzelne Tiere konnten bei den Testungen besonders lange auf der Walze verweilen, andere wenige erzielten kontinuierlich eher kurze Verweilzeiten. Man darf an dieser Stelle jedoch nicht außer Acht lassen, dass auch wenn man alle Tiere unter gleichen Bedingungen testet und jegliche Störfaktoren auf geringstem Niveau hält, jeder Organismus individuell ist und demzufolge Versuche am Individuum immer starken Schwankungen unterworfen sind. So sind auch hier die starken Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren in den Verhaltenstest trotz des gleichen genetischen Hintergrundes und trotz derselben Versuchsbedingungen durch starke Unterschiede in der Ausprägung der Tau-Pathologie zu erklären. Wären die Tiere dieser Studie insgesamt homogener in ihrer Entwicklung gewesen, wären die Unterschiede sicherlich noch deutlicher in den Verhaltenstests zu erkennen gewesen. Nichtsdestotrotz sind aussagefähige Resultate erzielt wurden.

Ziel der Rotarod-Untersuchung war die Evaluierung der motorischen Leistung und der Balancefähigkeit durch Verweilzeit auf dem Rotarod. Je länger ein Tier auf der sich drehenden Walze bei zunehmender Geschwindigkeit bleiben konnte, desto besser wurden seine motorischen Fähigkeiten eingeschätzt. Evaluiert wurde die Länge der Verweilzeit insgesamt, und ob sich die Verweildauer durch eine Behandlung mit oder ohne Tau-Immunisierung während des Versuchszeitraums bessert.

Der Rotarod-Test ist eine einfache und gut evaluierte Methode um motorische Defizite zu erkennen. Da alle Tiere unter gleichen Bedingungen der Testung unterzogen wurden, konnten Artefakte und Messfehler auf ein, für die Testergebnisse optimales Minimum reduziert werden. Es wurde bewusst das akzelerierte Rotarodmodell gewählt. Eine andere Möglichkeit wäre die Testung der Tiere bei verschiedenen konstanten Geschwindigkeiten gewesen. Bei der akzelerierten Art der Testung sind aber weniger Laufversuche nötig und die Gefahr von Ermüdungserscheinungen wird minimiert, welche die Testergebnisse verfälschen würden.

Alle Messungen wurden mehrfach an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt um singuläre Fehler möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurden alle Messungen verblindet vorgenommen. Somit ist keine unwillkürliche Beeinflussung der Testergebnisse seitens des Versuchsleiters zu erwarten.

Die Kombination dieser Mechanismen und Methoden ermöglicht es trotz der Störanfälligkeit belastbare Ergebnisse aus dem Experiment zu ziehen.

Die Messungen des Rotarod-Tests in dieser Studie ergaben, dass die Tiere, die mit Tau-Protein immunisiert wurden, länger auf der Rotarodwalze verweilen können. Dieser Unterschied ist in Trial 1 und 3 sowohl zwischen der Tau- und der Kontrollgruppe signifikant, als auch zwischen Mock- und Tau-Gruppe. Kontroll- und Mock-Gruppe dagegen unterscheiden sich in der Verweilzeit kaum. Aufgrund der großen Anzahl an Messungen, kann man auch einen aussagefähigen Trend in Trial 2 vermuten, der ähnliche Resultate, wie Trial 1 oder 3 aufweist: eine Immunisierung mit Tau führt zu einer verlängerten Verweilzeit auf dem Rotarod.

Wiederholte Messungen haben einen Trainingseffekt bei den Tieren. Diesen sieht man in der Tau-Gruppe am deutlichsten. Hier nimmt die Verweilzeit der Tiere immer von Trial zu Trial etwas zu. Die Messungen in den anderen beiden Gruppen schwanken von Trial zu Trial ein wenig, zeigen aber weder eine Wertverschiebung in Richtung höherer, noch Richtung niedrigerer Verweilzeiten. Die Immunisierung scheint also auch eine positive Wirkung auf den Trainingserfolg zu haben.

Die Ergebnisse des Rotarod-Testes zeigen unmissverständlich, dass eine Tau-Immunisierung zu einer längeren Verweilzeit auf dem Rotarod-Apparat führt, und demzufolge die motorische Leistungen der Tau-Immunisierten länger erhalten bleiben muss, als die der Kontroll-, bzw. Mock-Gruppe. Dies lässt vermuten, dass eine Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Fragmenten die motorischen Fähigkeiten erhält und demzufolge weniger Motoneurone absterben. Da die Ergebnisse signifikante Unterschiede in den Gruppen zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass trotz interindividueller Unterschiede durch gering unterschiedlich ausgeprägte Phänotypen, die gewonnen Daten solide sind.

Ähnliche Ergebnisse, wie die hier besprochenen, erbrachte bereits eine Studie von Asuni et al. 2007. Sie verglichen ebenfalls P301L-Mäuse, allerdings unterschiedlichen Geschlechtes. Außerdem wurden nur zwei Gruppen betrachtet: Eine, die mit Tau-Peptid immunisiert wurde, und eine, die keine Behandlung erhielt (Kontrollgruppe). Dabei zeigten sich in den verschiedenen Verhaltenstests, u. a. auch im Rotarod-Test, in der Kontrollgruppe deutlich schlechtere Ergebnisse im Vergleich zur Tau-immunisierten Gruppe. Um möglichst homogene Tiere vergleichen zu können, wurden in dieser Arbeit nur Tiere des gleichen (weiblichen) Geschlechtes

untersucht. Eine Erweiterung der Studie um eine zusätzliche Gruppe, der Mock-Gruppe, sollte v. a. die Frage klären, ob eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems auch einen Nutzen gegenüber der AD-Pathologie bringt, und ob diese ähnliche Resultate erzielt, wie die Tau-Immunisierung. Es zeigte sich schließlich, dass eine Tau-Immunisierung den Prozess der Neurodegeneration bremst und die Tau-immunisierten Tiere die Verhaltenstests souveräner meistern als die Tiere, die einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems unterzogen wurden.

Bei der Mock-Gruppe zeigt sich zwar kein signifikanter Unterschied in den sensimotorischen Tests oder in der Quantifizierung der Motoneurone im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es lässt sich jedoch eine Tendenz erkennen, die vermuten lässt, dass eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems auch zu einer Reduktion der Neurodegeneration führen kann. Man könnte hier noch erweiternde Studien mit anderen irrelevanten Antigenen, wie z. B. Ovalbumin durchführen. Immunisierungen mit irrelevanten Antigenen führen in der Regel zu einer Bildung von spezifischen Antikörpern durch die Plasmazellen und zu einer T-Zell-abhängigen Immunantwort, die auch hier die Pathologie der AD bremsen könnten. Epidemiologische Studien zeigen, dass Autoimmunerkrankungen, wie z. B. die rheumatoide Arthritis negative Risikofaktoren der AD darstellen (Jenkinson et al. 1989). Boyd et al. 2010 griffen diesen Ansatz auf und untersuchten die Wirkung von Kolonie stimulierenden Faktoren (CSF), die v. a. bei der rheumatoiden Arthritis in erhöhten Konzentrationen gefunden werden, auf transgene AD-Mäuse. Zunächst wurde CSF unilateral in den Hippocampus der transgenen Tiere injiziert. Die nicht behandelte, kontralaterale Seite diente zur Kontrolle. Anschließende Messungen zeigten eine höhere β -Amyloid-Konzentration in der unbehandelten Seite. Anschließend wurde anderen transgen veränderten Tieren subkutan CSF appliziert. Diese Tiere schnitten in folgenden kognitiven Tests besser ab als die Tiere der Kontrollgruppe, die nur NaCl verabreicht bekamen (Boyd et al. 2010).

Am Beginn neurodegenerativer Erkrankungen, wie der AD, stehen Inflammationsprozesse im ZNS. Diese locken körpereigene Immunzellen (CD4-T-Zellen, Monozyten, Mikroglia etc.) an. Diese sollen die Inflammation eingrenzen, verstärken sie aber vermutlich durch z. B. Ausschüttung von entzündungssteigernden Substanzen. Verschiedene Studien versuchten deshalb

diese körpereigene Abwehr zu drosseln, um so das Voranschreiten der Inflammation zu bremsen (Schwartz und Shechter 2010). U. a. erforschte man die Wirkung von Entzündungshemmern, wie nicht-steroidalen Antirheumatika (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID), deren Ergebnisse jedoch variieren. Zu meist fand keine Veränderung bis hin zur Verschlechterung des Krankheitsverlaufes statt (Breitner, J C S et al. 2009; Szekely et al. 2008; Arvanitakis et al. 2008; Aisen et al. 2003; Lyketsos et al. 2007; in 't Veld, B A et al. 2001). Es ist trotzdem nicht ganz klar, ob eine antiinflammatorische Behandlung nicht doch einen gewissen Nutzen bringt. Wahrscheinlich ist aber, dass eine spezifische Aktivierung des Immunsystems die größere Wirkung erzielt (Schwartz und Shechter 2010).

Die Quantifizierung der Motoneurone sollte eine mögliche Relation von motorischer Leistung zur Zellanzahl der α -Motoneurone ermöglichen. Hierzu wurde der Durchmesser der Motoneurone ab einer Größe von 10 μm in einem Bereich definierter Größe (250 x 250 μm) mittig im Vorderhorn gemessen. Um auch hier wieder Störgrößen so gering wie möglich zu halten, wurden nur Zellen gezählt, die bestimmte äußerliche Merkmale (Nucleus der Zelle und min. ein abgehender Dendrit mussten erkennbar sein), die leicht zu detektieren waren, aufwiesen. Außerdem wurden die Zählungen von zwei unabhängigen Personen verblindet durchgeführt, um Messfehler oder Zufallsergebnisse zu vermeiden. Beide Zählenden kamen auf sehr ähnliche Ergebnisse. Problematisch war, dass nicht alle Präparate in einem einwandfreien Zustand waren. Einzelne Schnitte wurden durch die Präparation oder den Prozess der Einbettung leicht beschädigt, so dass die Zählung der α -Motoneurone in diesen Schnitten nicht einwandfrei durchgeführt werden konnte. Hierdurch büßen die Ergebnisse der Zählung geringfügig an Aussagekraft ein.

Im Zuge der Tauopathie kommt es zu vermehrtem Zelluntergang, im Mausmodell auch zum Untergang der α -Motoneurone (Lewis et al. 2000). Eine starke Degeneration der lumbalen Motoneurone führt unweigerlich zu Einschränkungen in Motorik, Kraft und Reflexen. Diese wiederum würden sich auch in den Verhaltenstests zeigen. In dieser Studie konnte bereits bewiesen werden, dass es aufgrund der Neurodegeneration zu Einschränkungen der motorischen Leistung kommt und, dass die Tiere, die mit einer Tau-Immunisierung behandelt wurden, deutlich bessere Ergebnisse im Rotarod erzielen. An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob auch Unterschiede auf histologischer Ebene nachweisbar sind, die die

Vermutung, dass die Tau-Immunisierung protektiv auf die Motoneurone wirkt, bestätigen würde.

In den lumbalen Vorderhörnern der Tau-Immunisierten Tiere lassen sich mehr α -Motoneurone nachweisen, als in denen der Mock- und der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist signifikant. Ebenso weisen die Mock-immunisierten Mäuse mehr α -Motoneurone auf, als die Tiere der Kontrollgruppe, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Dennoch ist ein Trend zu erkennen, der die Ergebnisse des Rotarod-Tests unterstützen würde. Gerade wenn man die Verteilung der einzelnen Ergebnisse betrachtet, erkennt man, dass v. a. Tau-Immunisierte Tiere eine höhere Anzahl an α -Motoneuronen aufweisen und Mock-Immunisierte oder Versuchstiere der Kontrollgruppe eher zu einer niedrigeren Anzahl an α -Motoneuronen tendieren. Auch wenn die Messungen der Mock-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich zur Tau- oder Kontrollgruppe sind, ist eine deutliche Tendenz erkennbar, die zeigt, dass eine Mock-Immunisierung einen protektiven Effekt auf den Motoneuronenuntergang in den Vorderhörnern hat. Demzufolge führt auch eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems zu einer weniger stark voranschreitenden Tau-Pathologie. Der signifikante Unterschied zwischen Tau- und Kontrollgruppe beweist, dass eine Immunisierung mit Tau am stärksten präventiv auf eine gesteigerte Neurodegeneration wirkt und somit motorische Fähigkeiten länger erhalten bleiben. Es kommt zu weniger Zellverlusten und demzufolge zu weniger stark ausgeprägten Verhaltensauffälligkeiten.

In vielen anderen wissenschaftlichen Arbeiten (Boimel et al. 2010; Boutajangout et al. 2011; Chai et al. 2011) zu Tau-Immunisierungsversuchen wurden für die Analyse eher Hirnschnitte als Rückenmarksquerschnitte verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind eher zu vergleichen mit den Motoneuron-Quantifizierungen von Lewis et al. 2000 oder Allen et al. 2002. Sie konnten darlegen, dass die Motoneuronenanzahl im Rückenmark von P301L-Mäusen um bis zu 48% abnimmt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Es ließ sich in den P301L-Tieren auch eine Muskelatrophie und starke motorische Defizite nachweisen, passend zur Neurodegeneration auf Rückenmarksebene (Lewis et al. 2000). Die von Allen et al. verwendeten Tiere mit der P301S-Mutation bilden ebenfalls nach etwa einem halben Jahr eine Paraparese aus. Ebenso ließen sich in ihren Rückenmarks- und Hirngewebsquerschnitten

vermehrt Ansammlungen von hyperphosphoryliertem Tau und eine Neurodegeneration nachweisen (Allen et al. 2002).

Außerdem können durch die Betrachtung des Rückenmarks leichter Rückschlüsse auf die betroffenen motorischen Regionen gezogen werden, welche wiederum in Verhaltenstest und anderen motorischen Untersuchungsverfahren eruiert werden können. Aufbauend auf den Erkenntnissen von Asuni et al., 2007 wurden in dieser Studie Querschnitte des Rückenmarkes statt des Großhirns von unterschiedlich behandelten, weiblichen P301L-Mäusen verwendet. Es erschien damit ein direkterer Vergleich möglich zu sein zwischen motorischem Defizit und Ort des pathologischen Ursprungs (Asuni et al. 2007).

Auch in dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob denn die Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat tatsächlich mit der Anzahl der Motoneurone korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Variablen voneinander abhängen. Je mehr Motoneurone im Rückenmark der Versuchstiere erhalten geblieben waren, desto länger konnten sich die Tiere auf dem Rotarod-Apparat halten, desto besser schienen ihre motorischen Funktionen also noch erhalten geblieben zu sein. Die Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat ist jedoch nicht nur von der Anzahl der Motoneurone im Rückenmark abhängig, sondern auch von vielen anderen Variablen (Verfassung des Tieres am Versuchstag, Störfaktoren während des Versuchsablaufs, Messfehler, etc.). Deswegen ist die Korrelation zwar deutlich, jedoch nicht sehr stark, geschweige denn perfekt. Der eindeutige Trend aus der Abb. 4.3, sowie der errechneten positiven Korrelationskoeffizient beweisen aber, dass die Anzahl der Motoneurone einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Verweilzeit, also die motorische Leistungsfähigkeit der Tiere hat.

Die Ergebnisse des Rotarod-Testes, wie auch die Quantifizierung der Motoneurone lassen vermuten, dass eine Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Fragmenten die motorischen Fähigkeiten erhält, sowie einen protektiven Effekt auf den Motoneuronenuntergang in den Vorderhörnern hat und demzufolge die Muskelkraft länger erhalten bleibt und die Neurodegeneration verhindert oder zumindest gebremst wird. Dieser Prozess zeigte sich nur durch eine Immunisierung mit Tau, eine Mock-Behandlung brachte keinen aussagekräftigen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am deutlichsten zeigen sich diese Ergebnisse in den Rotarod-Messungen. Jedoch könnten fortführende Untersuchungen vielleicht

bessere Ergebnisse erzielen, mit einem Mausphänotyp, der dem menschlichen AD-Phänotyp ähnlicher ist. So könnten v. a. im Hinblick auf einen möglichen Therapieansatz beim Menschen aussagekräftigere Ergebnisse erzielt werden.

Ein anderer interessanter Ansatz stellt womöglich auch ein früheres Eingreifen in den Krankheitsprozess dar. In unserer Studie könnte die Taupathologie bereits zu weit vorangeschritten gewesen sein. Man könnte die Tau-Immunisierung durchführen bevor Phosphorylierungen zu einer irreversiblen Tau-Aggregat-Bildung geführt haben und anschließend ermitteln, ob sich die einzelnen Gruppen noch stärker in den Verhaltenstests unterscheiden.

Wie genau es zur Auflösung der Tauaggregate kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Erklärungsansätze wären, dass es durch eine aktive Immunisierung zu einer humoralen Antwort kommt, bei der durch eine Aktivierung von B-Lymphozyten spezifische Antikörper gebildet werden, welche wiederum das Monozyten/Makrophagen-System aktivieren (diese richten sich gegen das fremde Antigen). Ebenso kommt es zu einer zellulären Immunantwort bei der v. a. T-Zellen aktiviert werden. Die T-Zellen gelangen ins Gehirn und lösen dort eine Immunreaktion aus, die zu einer Beseitigung von Tau-Aggregaten beiträgt. Solche T-Zellaktivierungen durch eine Immunisierung mit A β waren in vergangenen klinischen Tests Ursache heftiger Nebenwirkungen, besonders in Form von Meningoenzephalitis (Orgogozo et al. 2003; Gilman et al. 2005). Andererseits könnte auch eine Monozyten-Infiltration ins ZNS Mikroglia aktivieren und damit eine vermehrte Phagozytose induzieren, so dass zunehmend Tau-Aggregate abgebaut werden. Gu et al. konnten Anhäufungen von Tau-Antikörpern in Mikroglia nachweisen, die für eine Phagozytose von extrazellulären Tau-Antikörper-Aggregat-Komplexen durch die Mikroglia sprechen würden (Gu et al. 2013).

Antikörper sind aber auch selbst in der Lage die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden (Nerenberg und Prasad 1975). Außerdem gehen viele neurodegenerative Erkrankungen, wie die AD, mit einer Störung der BHS einher (Zlokovic 1997). Ebenso ist es durchaus möglich, dass die Antikörper sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres Tau-Protein binden. So können die Antikörper einerseits ins Gehirn gelangen, an extrazelluläre Tau-Aggregate binden (Sigurdsson 2009), sie neutralisieren und ihre weitere Prion-artige Verbreitung unterbinden (Kfoury et al. 2012). Vermutet wird, dass sich die Tau-Aggregate von Zelle zu Zelle verbreiten und dadurch physio-

logisches Tau-Protein zur Fehlfaltung bewegen, ähnlich wie bei Prionen-Erkrankungen. Eine Zelle setzt Tau-Protein-Aggregate extrazellulär frei, welche von einer anderen Zelle aufgenommen werden. Durch den Kontakt mit abnorm gefaltetem Tau-Protein wird eine Fehlfaltung im physiologischen Tau-Protein induziert und dieses schließlich wieder freigesetzt. Möglicherweise greift ein anti-Tau-Antikörper in diese Zell-Zell-Interaktion ein, in dem er extrazelluläre Tau-Fibrillen abfängt und am Eintritt in die Zelle hindert (Kfoury et al. 2012).

Eine andere Möglichkeit wäre, dass Antikörper-Tau-Aggregat-Komplexe endozytiert werden und ins Proteasomen gelangen mit Hilfe sog. *Tripartite motif containing proteins* (z. B. TRIM21) (McEwan et al. 2013), die als intrazelluläre Antikörper-Rezeptoren fungieren. TRIMs spielen eine Rolle bei verschiedenen molekularen Funktionen. Sie wirken mit bei Transkriptions- und post-translationalen Vorgängen, ebenso bei Apoptose, Zelldifferenzierung, Zellentwicklung, Onkogenese usw. (Meroni und Diez-Roux 2005). Alle TRIMs besitzen homologe Strukturen, die es ihnen ermöglichen post-translationale Modifizierungen in Form von Ubiquitinierung vorzunehmen und somit auch in immunregulatorische Vorgänge einzugreifen (Rajsbaum et al. 2014). Hierbei können freie C-terminale Glycinreste von Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Molekülen mit den Lysinresten spezifischer Substrate konjugiert werden (Trempe 2011). Ubiquitin selbst besitzt ebenfalls verschiedene Lysine an welche weitere Ubiquitinketten angehängt werden können. Polyubiquitine dienen als Erkennungssignal für Degradationsvorgänge im Proteasomen (Rajsbaum et al. 2014). Diese Eigenschaft scheint v. a. auch bei Bekämpfung von Viren eine entscheidende Rolle zu spielen. So z. B. können Virus-Antikörper-Komplexe an den zytosolischen IgG-Rezeptor von TRIM21. TRIM21 verfügt außerdem über eine Polyubiquitin-Ligase-Aktivität, mit der sie Polyubiquitinketten an das abzubauen Substrat hängt, diese von Zielstrukturen erkannt werden und den Komplex ins Proteasomen überführen (Mallery et al. 2010; McEwan et al. 2013; Geijtenbeek und Gringhuis 2013; Yanamandra et al. 2013). TRIMs konnten bisher in verschiedenen Stellen der Zelle lokalisiert werden, so z. B. um den Nucleus, im Zytoplasma konzentriert oder an verschiedene Filamente gebunden, ebenso aber auch an Mikrotubuli (Rajsbaum et al. 2014). Es ist also durchaus möglich, dass ihre immunologische Funktion nicht nur auf Viren beschränkt ist, sondern auch in der Beseitigung von Protein-Aggregaten eine Rolle spielt. Bestimmte Isoformen von TRIMs könnten Antikör-

per-Tau-Aggregat-Komplexe erkennen, polyubiquitinieren und dadurch deren Abbau über die Proteasomen fördern (Rajsbaum et al. 2014).

Des Weiteren kann eine Verringerung von Tau-Aggregaten extrazellulär auch den intrazellulären Anteil senken. Wenn extrazelluläre Tau-Aggregate beseitigt werden, kommt es zu einem Konzentrationsgefälle an Tau, wodurch vermehrt Tau aus der Zelle transportiert wird (Sigurdsson 2009), andererseits könnten auch Antikörper in die Neurone gelangen und dort wirken (Gu et al. 2013). Hierbei fördern sie vermutlich den Abbau der Tau-Aggregate über die Lysosomen (Krishnamurthy et al. 2011). Studien konnten zeigen, dass eine Dysfunktionen in den Lysosomen zu AD und anderen Tauopathien führen kann (Nixon und Cataldo 2006). Auch führt eine Hemmung der Lysosomen zu einer Zunahme an Tau-Aggregaten (Bendiske und Bahr 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Protein-Fragmenten den Zelluntergang der α -Motoneurone im Rückenmark hemmt und demzufolge die Ausbildung motorischer Defizite hinausgezögert wird. Durch die Immunisierung wird das Voranschreiten der Tauopathie gebremst. Diese Aussage kann zwar auch für eine unspezifische Immunisierung getroffen werden, jedoch ist die Wirkung einer spezifischen Tau-Immunisierung weitaus bedeutender.

Die weitere Erforschung des molekularen Mechanismus der therapeutischen Wirkung der Tau-Immunisierung ist notwendig, um die Effizienz der Intervention zu steigern und mögliche Nebenwirkungen zu verringern.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Testung einer aktiven Tau-Immunisierung zur Verminderung der Motoneuronendegeneration im Tau-transgenen Mausmodell

Eingereicht von Marie-Catherine Schaller

Angefertigt am 23. Juni 2015 am Paul-Flechsig-Institut für medizinische Hirnforschung

Betreut von PD Dr. Max Holzer

Juni 15

Die Alzheimer-Krankheit ist ein, durch Neurodegeneration verursachtes Demenz-Syndrom des Alters, das sich v. a. in fortschreitenden kortikalen und subkortikalen Atrophien des Hirnparenchyms, sowie in fortschreitender Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit äußert. Hauptmerkmal der AD sind histologische Veränderungen in der Hirnrinde. Hierzu gehören die senilen Plaques und die neurofibrillären Tangles (NFTs).

Es sind zwei entscheidende pathologische Merkmale bekannt, die zur Diagnose der AD im Isokortex vorhanden sein müssen und auch zu den Funktionsverlusten bei der AD beitragen können. Dies sind die extrazellulären senilen Plaques aus β -Amyloid (A β) und die intrazellulären Neurofibrillären Tangles (NFT) aus aggregiertem Tau-Protein.

Eine Ursache der Krankheitsentstehung ist auf eine Störung der Faltung des Tau-Proteins zurückzuführen. Die Hauptfunktion des Tau-Proteins ist die Nukleation und die Stabilisierung der Mikrotubuli. Wird Tau vermehrt phosphoryliert, kann es die

Mikrotubuli nicht mehr ausreichend stabilisieren und diese zerfallen. Damit sind der Stofftransport und die -weiterleitung über die Mikrotubuli gestört. Das übrigbleibende hyperphosphorylierte Tau lagert sich zu dicht gepackten, paarigen Proteinsträngen (paarige helikale Filamente, PHF) zusammen, die wiederum die sogenannten NFT bilden. Durch diese werden die Neuronen in ihrer Funktion beeinträchtigt, später gehen sie infolgedessen unter (neurofibrilläre Degeneration).

Die Tau-Phosphorylierung wird über verschiedene Proteinkinasen reguliert. Eine Vielzahl von Proteinen mit Tau-Phosphorylierungsaktivität, wie *Cyclin-dependent-kinase 5* (CDK5), *Mitogen-activated-protein-kinase* (MAPK) oder Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3) sind identifiziert wurden. Es ist noch nicht ganz sicher, ob eine Hyperphosphorylierung von Tau wirklich neurotoxisch wirkt. Sie stellt jedoch die Vorbedingung für die Aggregation in vivo dar.

Die Vermutung, dass A β -Plaques und NFTs als Aggregationsendprodukte die alleinige Ursache der Neurodegeneration sind, ist inzwischen umstritten. Vermutet wird, dass die löslichen, oligomeren Aggregationsprodukte von A β und Tau die mögliche Ursache der Krankheit ausmachen.

Bisher kann die AD noch nicht geheilt werden. Es existieren wenige Medikamente, die die Symptome gering beeinflussen, wie z. B. Acetylcholinesterasehemmer, und NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Diese können jedoch nicht das Voranschreiten der Krankheit stoppen.

Neueste Versuche, die Therapieverfahren gegen die AD erproben, tendieren immer stärker zu Immunisierungsverfahren. So versucht man u. a. mittels einer Immunisierung mit A β -Bruchstücken, die die A β -Aggregation verhindern sollen, in die Entstehung von AD typischen Plaques einzugreifen. Zahlreiche Versuche einer Immunisierung gegen A β sind gescheitert, da es hierbei zwar zur Auflösung von A β -Plaques kam, jedoch nicht zu einer deutlichen Verbesserung der kognitiven Leistung. Bei wenigen immunisierten Probanden traten auch starke Nebenwirkungen auf. Neue Immunisierungsstudien wenden sich daher immer mehr einer Immunisierung mit Tau-Protein zu. Besonders Antigene mit Phospho-Tau-Epitopen zeigten gute Erfolge im Mausmodell. Phospho-Tau-Epitope sind ein Merkmal der Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und damit auch der Bildung von Tau-Aggregaten.

Diese Studie beschäftigt sich mit einer aktiven Immunisierung allerdings mit sog. pseudophosphorylierten Tau-Protein-Fragmenten. Beim Verfahren der Pseudophosphorylierung werden die Phosphat-Akzeptor-Aminosäuren Serin oder Threonin gegen Glutaminsäure oder Asparaginsäure ausgetauscht. So wird eine Art Phosphorylierungsmimikry erzeugt, welches nicht durch Phosphatasen entfernt werden kann und somit eine stabil hohe Immunogenität besitzt. Nach der aktiven Immunisierung sollte ihr Einfluss auf die Inhibierung der Tau-Protein-Aggregation und der damit verbundener Motoneurondegeneration von Tau-transgenen Mäusen anhand der motorischen Leistungsfähigkeit und anhand anatomischer Parameter (Quantifizierung lumbaler α -Motoneurone) evaluiert werden.

Als Mausmodell wurden 35 weibliche Mäuse ausgewählt, die transgen für die P301L-Mutation sind. Diese weisen frühzeitig eine ausgeprägte Tau-Aggregation auf und bilden damit eine starke Neurodegeneration aus.

Diese wurden auf drei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde mit pseudophosphorylierten Tau-Protein-Fragmenten behandelt. Eine andere erhielt eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems mittels kompletten Freundschens Adjuvans (Mock-immunisierte Gruppe). Die letzte Gruppe stellte eine unbehandelte Kontrollgruppe dar. Motorische und morphometrische Veränderungen innerhalb der Gruppen sollten anhand von Rotarod-Tests, sowie der Quantifizierung von α -Motoneuronen aufgedeckt und analysiert werden.

Ziel der Rotarod-Untersuchung war die Evaluierung der motorischen Leistung und der Balancefähigkeit anhand der Verweilzeit auf der Rotarod-Drehstab-Apparatur. Je länger ein Tier auf der sich drehenden Walze bei zunehmender Geschwindigkeit bleiben konnte, desto besser wurden seine motorischen Fähigkeiten eingeschätzt. Evaluiert wurde die Länge der Verweilzeit insgesamt, und ob sich die Verweildauer durch eine Behandlung mit oder ohne Tau-Immunisierung verändert.

Die Messungen ergaben, dass die Tiere, die mit Tau-Protein immunisiert wurden, länger auf der Rotarodwalze verweilen können (\bar{K} : 48,2 sek, SD = 12,8; \bar{M} : 51,6 sek, SD = 8,8; \bar{T} : 62,5 sek, SD = 21,3). Dieser Unterschied war in Trial 1 und 3 sowohl zwischen der Tau- und der Kontrollgruppe signifikant (Trial 1: $p \leq 0,027$ und Trial 3: $p \leq 0,019$), als auch zwischen Mock- und Tau-Gruppe (Trial 1: $p \leq 0,047$,

Trial 3: $p \leq 0,037$). Kontroll- und Mock-Gruppe dagegen unterschieden sich in der Verweilzeit kaum.

Die Quantifizierung der Motoneurone sollte eine mögliche Relation von motorischer Leistung zur Zellanzahl ermöglichen. Hierzu wurde der Durchmesser der Motoneurone ab einer Größe von $10\text{ }\mu\text{m}$ in einem Bereich definierter Größe ($250\text{ }\mu\text{m} \times 250\text{ }\mu\text{m}$) mittig im Vorderhorn gemessen. In den lumbalen Vorderhörnern der Tau-Immunisierten Tiere lassen sich mehr α -Motoneurone nachweisen (\bar{T} : 70, SD = 11,2), als in denen der Mock- und der Kontrollgruppe (\bar{M} : 63, SD = 9,6; \bar{K} : 52, SD = 19). Dieser Unterschied ist signifikant zur Kontrollgruppe (Tau/Kontrollgruppe: $p \leq 0,04$, Tau/Mock-Gruppe: $p \leq 0,38$). Ebenso wiesen die Vorderhörner der Mock-immunisierten Mäuse mehr α -Motoneurone auf, als die Kontrollgruppe, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Dennoch ist ein Trend zu erkennen, der die Ergebnisse des Rotarod-Tests unterstützen würde.

Untersucht wurde zuletzt noch, ob denn die Verweildauer auf dem Rotarod-Apparat tatsächlich mit der Anzahl der Motoneurone korreliert. Anhand eines Graphen, sowie an der Berechnung des Korrelationskoeffizienten ($r = 0,6$, $p \leq 0,05$) konnte gezeigt werden, dass beide Variablen signifikant miteinander korrelieren.

Die Ergebnisse des Rotarod-Tests, wie auch die Quantifizierung der Motoneurone zeigten, dass eine Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Fragmenten die motorischen Fähigkeiten erhält, sowie einen protektiven Effekt auf den Motoneuronenvitalität in den Vorderhörnern hat. Dieser Prozess zeigte sich auch tendenziell in der Mock-immunisierten Gruppe. Es lässt sich postulieren, dass eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems tendenziell auch zu einer Reduktion der Neurodegeneration führt.

Eine Immunisierung mit pseudophosphorylierten Tau-Proteinfragmenten bremst das Voranschreiten der Tauopathie, damit den Zelluntergang der α -Motoneurone im Rückenmark und zögert demzufolge die Ausbildung motorischer Defizite hinaus. Diese Aussage kann zwar auch für eine unspezifische Immunisierung getroffen werden, jedoch ist die Wirkung einer spezifischen Tau-Immunisierung weitaus effektiver.

7 Literaturverzeichnis

- Abramov, Andrey Y.; Canevari, Laura; Duchen, Michael R. (2004): Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. In: *J. Neurosci.* 24 (2), S. 565–575. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4042-03.2004.
- Adolfsson, Oskar; Pihlgren, Maria; Toni, Nicolas; Varisco, Yvan; Buccarello, Anna Lucia; Antonello, Katia et al. (2012): An effector-reduced anti- β -amyloid (A β) antibody with unique a β binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A β . In: *J. Neurosci.* 32 (28), S. 9677–9689. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4742-11.2012.
- Aisen, Paul S.; Schafer, Kimberly A.; Grundman, Michael; Pfeiffer, Eric; Sano, Mary; Davis, Kenneth L. et al. (2003): Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 289 (21), S. 2819–2826. DOI: 10.1001/jama.289.21.2819.
- Allen, Bridget; Ingram, Esther; Takao, Masaki; Smith, Michael J.; Jakes, Ross; Virdee, Kanwar et al. (2002): Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. In: *J Neurosci* 22 (21), S. 9340–9351.
- Alonso, A. C.; Zaidi, T.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. (1994): Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (12), S. 5562–5566.
- Alzheimer, A. (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. In: *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish-*, 1907 (64), S. 146–148.
- Andersen, Olav M.; Reiche, Juliane; Schmidt, Vanessa; Gotthardt, Michael; Spoelgen, Robert; Behlke, Joachim et al. (2005): Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (38), S. 13461–13466. DOI: 10.1073/pnas.0503689102.
- Andreasen, N.; Hesse, C.; Davidsson, P.; Minthon, L.; Wallin, A.; Winblad, B. et al. (1999): Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. In: *Arch Neurol* 56 (6), S. 673–680.

- Apelt, Jenny; Bigl, Marina; Wunderlich, Patrick; Schliebs, Reinhard (2004): Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. In: *International Journal of Developmental Neuroscience* 22 (7), S. 475–484. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2004.07.006.
- Arendt, T.; Bigl, V.; Tennstedt, A.; Arendt, A. (1984b): Correlation between cortical plaque count and neuronal loss in the nucleus basalis in Alzheimer's disease. In: *Neurosci Lett* 48 (1), S. 81–85.
- Arendt, T.; Bigl, V.; Walther, F.; Sonntag, M. (1984a): Decreased ratio of CSF acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase activity in Alzheimer's disease. In: *Lancet* 1 (8369), S. 173.
- Arendt, T.; Bruckner, M. K.; Lange, M.; Bigl, V. (1992): Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms. In: *Neurochem Int* 21 (3), S. 381–396.
- Arvanitakis, Z.; Grodstein, F.; Bienias, J. L.; Schneider, J. A.; Wilson, R. S.; Kelly, J. F. et al. (2008): Relation of NSAIDs to incident AD, change in cognitive function, and AD pathology. In: *Neurology* 70 (23), S. 2219–2225. DOI: 10.1212/01.wnl.0000313813.48505.86.
- Asuni, Ayodeji A.; Boutajangout, Allal; Quartermain, David; Sigurdsson, Einar M. (2007): Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. In: *J. Neurosci.* 27 (34), S. 9115–9129. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007.
- Bard, F.; Cannon, C.; Barbour, R.; Burke, R. L.; Games, D.; Grajeda, H. et al. (2000): Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. In: *Nat Med* 6 (8), S. 916–919. DOI: 10.1038/78682.
- Bard, Frederique; Barbour, Robin; Cannon, Catherine; Carretto, Robert; Fox, Michael; Games, Dora et al. (2003): Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (4), S. 2023–2028. DOI: 10.1073/pnas.0436286100.

- Baumeister et al. (1998): Amyloid-Aggregate, Präseniline und die Alzheimer-Krankheit. In: *Angew. Chemie* (110), S. 3148–3152, zuletzt geprüft am 05.10.2014.
- Beisiegel, U.; Weber, W.; Ihrke, G.; Herz, J.; Stanley, K. K. (1989): The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. In: *Nature* 341 (6238), S. 162–164. DOI: 10.1038/341162a0.
- Bendiske, Jennifer; Bahr, Ben A. (2003): Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis--an approach for slowing Alzheimer disease? In: *J Neuropathol Exp Neurol* 62 (5), S. 451–463.
- Bennett, David A. (2000): Part II. Clinical diagnosis and course of Alzheimer's disease. In: *Disease-a-Month* 46 (10), S. 666–687. DOI: 10.1016/S0011-5029(00)90029-4.
- Bien, J.; Jefferson, T.; Causevic, M.; Jumpertz, T.; Munter, L.; Multhaup, G. et al. (2012): The Metalloprotease Meprin Generates Amino Terminal-truncated Amyloid Peptide Species. In: *Journal of Biological Chemistry* 287 (40), S. 33304–33313. DOI: 10.1074/jbc.M112.395608.
- Boche, Delphine; Nicoll, James A R (2008): The role of the immune system in clearance of Abeta from the brain. In: *Brain Pathol.* 18 (2), S. 267–278. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2008.00134.x.
- Boimel, Moran; Grigoriadis, Nikolaos; Loubopoulos, Athanasios; Haber, Esther; Abramsky, Oded; Rosenmann, Hanna (2010): Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. In: *Exp. Neurol.* 224 (2), S. 472–485. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.05.010.
- Bombois, Stephanie; Muraige, Claude-Alain; Gompel, Marie; Deramecourt, Vincent; Mackowiak-Cordoliani, Marie-Anne; Black, Ronald S. et al. (2007): Absence of beta-amyloid deposits after immunization in Alzheimer disease with Lewy body dementia. In: *Arch Neurol* 64 (4), S. 583–587. DOI: 10.1001/archneur.64.4.583.
- Boutajangout, Allal; Ingadottir, Johanna; Davies, Peter; Sigurdsson, Einar M. (2011): Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. In: *J. Neurochem.* 118 (4), S. 658–667. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07337.x.

- Boutajangout, Allal; Quartermain, David; Sigurdsson, Einar M. (2010): Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. In: *J. Neurosci.* 30 (49), S. 16559–16566. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010.
- Boyd, Tim D.; Bennett, Steven P.; Mori, Takashi; Governatori, Nicholas; Runfeldt, Melissa; Norden, Michelle et al. (2010): GM-CSF upregulated in rheumatoid arthritis reverses cognitive impairment and amyloidosis in Alzheimer mice. In: *J Alzheimers Dis* 21 (2), S. 507–518. DOI: 10.3233/JAD-2010-091471.
- Breitner, J C S; Haneuse, S J P A; Walker, R.; Dublin, S.; Crane, P. K.; Gray, S. L.; Larson, E. B. (2009): Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in an elderly community-based cohort. In: *Neurology* 72 (22), S. 1899–1905. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181a18691.
- Brunden, Kurt R.; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M-Y (2008): Evidence that non-fibrillar tau causes pathology linked to neurodegeneration and behavioral impairments. In: *J Alzheimers Dis* 14 (4), S. 393–399.
- Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A. et al. (1992): Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. In: *J Biol Chem* 267 (1), S. 546–554.
- Cao, X. und Südhof, T. C. (2001): A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. In: *Science* 293 (5527), S. 115–120. DOI: 10.1126/science.1058783.
- Cardoso, Sandra M.; Santana, Isabel; Swerdlow, Russell H.; Oliveira, Catarina R. (2004): Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. In: *J. Neurochem.* 89 (6), S. 1417–1426. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02438.x.
- Carrasquillo, Minerva M.; Belbin, Olivia; Hunter, Talisha A.; Ma, Li; Bisceglia, Gina D.; Zou, Fanggang et al. (2011): Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease: a multi-centre case-control study. In: *Mol Neurodegener* 6 (1), S. 54. DOI: 10.1186/1750-1326-6-54.
- Caruso, Alessandra; Motolese, Marta; Iacovelli, Luisa; Caraci, Filippo; Copani, Agata; Nicoletti, Ferdinando et al. (2006): Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by

- apolipoprotein E4 in PC12 cells. In: *J. Neurochem.* 98 (2), S. 364–371. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03867.x.
- Castillo-Carranza, Diana L.; Lasagna-Reeves, Cristian A.; Kaye, Rakez (2013): Tau aggregates as immunotherapeutic targets. In: *Front Biosci (Schol Ed)* 5, S. 426–438.
- Castillo-Carranza, Diana L.; Sengupta, Urmi; Guerrero-Munoz, Marcos J.; Lasagna-Reeves, Cristian A.; Gerson, Julia E.; Singh, Gurpreet et al. (2014): Passive immunization with Tau oligomer monoclonal antibody reverses tauopathy phenotypes without affecting hyperphosphorylated neurofibrillary tangles. In: *J Neurosci* 34 (12), S. 4260–4272. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3192-13.2014.
- Cedazo-Minguez, A.; Popescu, B. O.; Blanco-Millan, J. M.; Akterin, S.; Pei, J-J; Winblad, B.; Cowburn, R. F. (2003): Apolipoprotein E and beta-amyloid (1-42) regulation of glycogen synthase kinase-3 β . In: *J Neurochem* 87 (5), S. 1152–1164.
- Cella, M.; Buonsanti, C.; Strader, C.; Kondo, T.; Salmaggi, A.; Colonna, M. (2003): Impaired Differentiation of Osteoclasts in TREM-2-deficient Individuals. In: *Journal of Experimental Medicine* 198 (4), S. 645–651. DOI: 10.1084/jem.20022220.
- Chai, Xiyun; Wu, Su; Murray, Tracey K.; Kinley, Robert; Cella, Claire V.; Sims, Helen et al. (2011): Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. In: *J. Biol. Chem.* 286 (39), S. 34457–34467. DOI: 10.1074/jbc.M111.229633.
- Chauhan, Ved; Chauhan, Abha (2006): Oxidative stress in Alzheimer's disease. In: *Pathophysiology* 13 (3), S. 195–208. DOI: 10.1016/j.pathophys.2006.05.004.
- Colonna, Marco (2003): TREMs in the immune system and beyond. In: *Nat. Rev. Immunol.* 3 (6), S. 445–453. DOI: 10.1038/nri1106.
- Cook, D. G.; Forman, M. S.; Sung, J. C.; Leight, S.; Kolson, D. L.; Iwatsubo, T. et al. (1997): Alzheimer's A β (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. In: *Nat Med* 3 (9), S. 1021–1023.
- Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W. et al. (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. In: *Science* 261 (5123), S. 921–923.

- Coyle, J. T.; Price, D. L.; DeLong, M. R. (1983): Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. In: *Science* 219 (4589), S. 1184–1190.
- Crawley, Jacqueline N. (2007): What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience.
- DeMattos, R. B.; Bales, K. R.; Cummins, D. J.; Dodart, J. C.; Paul, S. M.; Holtzman, D. M. (2001): Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (15), S. 8850–8855. DOI: 10.1073/pnas.151261398.
- Dodel, Richard; Rominger, Axel; Bartenstein, Peter; Barkhof, Frederik; Blennow, Kaj; Förster, Stefan et al. (2013): Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. In: *The Lancet Neurology* 12 (3), S. 233–243. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70014-0.
- Dubois, Bruno; Feldman, Howard H.; Jacova, Claudia; DeKosky, Steven T.; Barberger-Gateau, Pascale; Cummings, Jeffrey et al. (2007): Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. In: *The Lancet Neurology* 6 (8), S. 734–746. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70178-3.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. In: *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 46 (3), S. 208–209.
- Eaton, Suzanne (2008): Retromer retrieves wntless. In: *Dev. Cell* 14 (1), S. 4–6. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.12.014.
- Faes, Günter (2014): t-Test zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten r. Hg. v. Günter Faes. Dormagen. Online verfügbar unter <http://www.faes.de/Basis/Basis-Statistik/Basis-Statistik-Korrelation-Re/Basis-Statistik-K-R-t-Test/basis-statistik-k-r-t-test.html>, zuletzt aktualisiert am 28.12.2014, zuletzt geprüft am 15.04.2015.
- Ferrer, Isidre; Boada Rovira, Merce; Sanchez Guerra, Maria Luisa; Rey, Maria Jesus; Costa-Jussa, Frederic (2004): Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. In: *Brain Pathol* 14 (1), S. 11–20.

- Flach, Katharina; Hilbrich, Isabel; Schiffmann, Andrea; Gartner, Ulrich; Kruger, Martin; Leonhardt, Marion et al. (2012): Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. In: *J Biol Chem* 287 (52), S. 43223–43233. DOI: 10.1074/jbc.M112.396176.
- Frisoni, G. B.; Pievani, M.; Testa, C.; Sabattoli, F.; Bresciani, L.; Bonetti, M. et al. (2007): The topography of grey matter involvement in early and late onset Alzheimer's disease. In: *Brain* 130 (3), S. 720–730. DOI: 10.1093/brain/awl377.
- Frost, Jeffrey L.; Le, Kevin X.; Cynis, Holger; Ekpo, Elizabeth; Kleinschmidt, Martin; Palmour, Roberta M. et al. (2013): Pyroglutamate-3 amyloid- β deposition in the brains of humans, non-human primates, canines, and Alzheimer disease-like transgenic mouse models. In: *Am. J. Pathol.* 183 (2), S. 369–381. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.05.005.
- Galasko, D.; Chang, L.; Motter, R.; Clark, C. M.; Kaye, J.; Knopman, D. et al. (1998): High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. In: *Arch Neurol* 55 (7), S. 937–945.
- Geijtenbeek; Gringhuis (2013): An inside job for antibodies: tagging pathogens for intracellular sensing. In: *Nat Immunol* 14 (4), S. 309–311. DOI: 10.1038/ni.2574.
- Ghebremedhin E; Schultz C; Braak E; Braak H. (1998): High Frequency of Apolipoprotein E e4 Allele in Young Individuals with Very Mild Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes. In: *Experimental Neurology* (153(1)), S. 152-5., zuletzt geprüft am 05.10.2014.
- Gilman, S.; Koller, M.; Black, R. S.; Jenkins, L.; Griffith, S. G.; Fox, N. C. et al. (2005): Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. In: *Neurology* 64 (9), S. 1553–1562. DOI: 10.1212/01.WNL.0000159740.16984.3C.
- Glenner, G. G.; Wong, C. W. (1984a): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. In: *Biochem Biophys Res Commun* 120 (3), S. 885–890.
- Glenner, G. G.; Wong, C. W. (1984b): Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. In: *Biochem Biophys Res Commun* 122 (3), S. 1131–1135.

- Glennner, George G.; Wong, Caine W. (1984, August): Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122 (3), S. 1131–1135. DOI: 10.1016/0006-291X(84)91209-9.
- Glodzik-Sobanska, Lidia; Pirraglia, Elizabeth; Brys, Mirosław; Santi, Susan de; Mosconi, Lisa; Rich, Kenneth E. et al. (2009): The effects of normal aging and ApoE genotype on the levels of CSF biomarkers for Alzheimer's disease. In: *Neurobiol. Aging* 30 (5), S. 672–681. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.019.
- Goate, A.; Chartier-Harlin, M. C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L. et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. In: *Nature* 349 (6311), S. 704–706. DOI: 10.1038/349704a0.
- Goedert, M.; Spillantini, M. G. (2000): Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. In: *Biochim Biophys Acta* 1502 (1), S. 110–121.
- Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Potier, M. C.; Ulrich, J.; Crowther, R. A. (1989): Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. In: *EMBO J* 8 (2), S. 393–399.
- Golombowski, Sidonie; Müller-Spahn, Franz; Romig, Helmut; Mendla, Klaus; Hock, Christoph (1997): Dependence of cerebrospinal fluid Tau protein levels on apolipoprotein E4 allele frequency in patients with Alzheimer's disease. In: *Neuroscience Letters* 225 (3), S. 213–215. DOI: 10.1016/S0304-3940(97)00228-0.
- Gong, C. X.; Shaikh, S.; Wang, J. Z.; Zaidi, T.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. (1995): Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. In: *J Neurochem* 65 (2), S. 732–738.
- Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (13), S. 4913–4917.

- Gu, Jiaping; Congdon, Erin E.; Sigurdsson, Einar M. (2013): Two novel Tau antibodies targeting the 396/404 region are primarily taken up by neurons and reduce Tau protein pathology. In: *J Biol Chem* 288 (46), S. 33081–33095. DOI: 10.1074/jbc.M113.494922.
- Haass, C. (1997): Presenilins: genes for life and death. In: *Neuron* 18 (5), S. 687–690.
- Haft, C. R.; de la Luz Sierra, M; Bafford, R.; Lesniak, M. A.; Barr, V. A.; Taylor, S. I. (2000): Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. In: *Mol Biol Cell* 11 (12), S. 4105–4116.
- Hanger, Diane P.; Anderton, Brian H.; Noble, Wendy (2009): Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. In: *Trends Mol Med* 15 (3), S. 112–119. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.01.003.
- Hardy, John; Selkoe, Dennis J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. In: *Science* 297 (5580), S. 353–356. DOI: 10.1126/science.1072994.
- Hartmann, T.; Bieger, S. C.; Bruhl, B.; Tienari, P. J.; Ida, N.; Allsop, D. et al. (1997): Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. In: *Nat Med* 3 (9), S. 1016–1020.
- Hausmann, George; Banziger, Carla; Basler, Konrad (2007): Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (4), S. 331–336. DOI: 10.1038/nrm2141.
- Hernández, Félix; Gómez de Barreda, Elena; Fuster-Matanzo, Almudena; Lucas, José J.; Avila, Jesús (2010): GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. In: *Exp. Neurol.* 223 (2), S. 322–325. DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.09.011.
- Herz, Joachim; Bock, Hans H. (2002): Lipoprotein receptors in the nervous system. In: *Annu. Rev. Biochem.* 71, S. 405–434. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135342.
- Hock, Christoph; Konietzko, Uwe; Streffer, Johannes R.; Tracy, Jay; Signorell, Andri; Müller-Tillmanns, Britta et al. (2003): Antibodies against β -Amyloid Slow Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. In: *Neuron* 38 (4), S. 547–554. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00294-0.

- Hoe, Hyang-Sook; Freeman, Jacob; Rebeck, G. William (2006): Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. In: *Mol Neurodegener* 1, S. 18. DOI: 10.1186/1750-1326-1-18.
- Hofmann, Eberhard (2006): Medizinische Biochemie systematisch. 4. Aufl. Bremen, Boston: Uni-Med (Klinische Lehrbuchreihe).
- Holzer, M.; Holzapfel, H.-P.; Zedlick, D.; Brückner, M. K.; Arendt, T. (1994): Abnormally phosphorylated tau protein in Alzheimer's disease: Heterogeneity of individual regional distribution and relationship to clinical severity. In: *Neuroscience* 63 (2), S. 499–516. DOI: 10.1016/0306-4522(94)90546-0.
- in t' Veld, B A; Ruitenberg, A.; Hofman, A.; Launer, L. J.; van Duijn, C M; Stijnen, T. et al. (2001): Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. In: *N Engl J Med* 345 (21), S. 1515–1521. DOI: 10.1056/NEJMoa010178.
- Jacobs, D.; Sano, M.; Marder, K.; Bell, K.; Bylsma, F.; Lafleche, G. et al. (1994): Age at onset of Alzheimer's disease: relation to pattern of cognitive dysfunction and rate of decline. In: *Neurology* 44 (7), S. 1215–1220.
- Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P T Jr (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. In: *Biochemistry* 32 (18), S. 4693–4697.
- Jellinger KA (2005): Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) - Eine aktuelle Übersicht. In: *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* (6), S. 9–18, zuletzt geprüft am 05.10.2014.
- Jenkinson, M. L.; Bliss, M. R.; Brain, A. T.; Scott, D. L. (1989): Rheumatoid arthritis and senile dementia of the Alzheimer's type. In: *Br J Rheumatol* 28 (1), S. 86–88.
- Jiang, Qingguang; Lee, C Y Daniel; Mandrekar, Shweta; Wilkinson, Brandy; Cramer, Paige; Zelcer, Noam et al. (2008): ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. In: *Neuron* 58 (5), S. 681–693. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.04.010.
- Jick, H.; Zornberg, G. L.; Jick, S. S.; Seshadri, S.; Drachman, D. A. (2000): Statins and the risk of dementia. In: *The Lancet* 356 (9242), S. 1627–1631. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03155-X.

- Kfoury, Najla; Holmes, Brandon B.; Jiang, Hong; Holtzman, David M.; Diamond, Marc I. (2012): Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. In: *J Biol Chem* 287 (23), S. 19440–19451. DOI: 10.1074/jbc.M112.346072.
- Khatoon, S.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. (1994): Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. In: *FEBS Lett* 351 (1), S. 80–84.
- Koedam, E.; Lauffer, Vivian; van der Vlies, Annelies E; van der Flier, Wiesje M; Scheltens, Philip; Pijnenburg, Yolande A L (2010): Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. In: *J. Alzheimers Dis.* 19 (4), S. 1401–1408. DOI: 10.3233/JAD-2010-1337.
- Krishnamurthy, Pavan K.; Deng, Yan; Sigurdsson, Einar M. (2011): Mechanistic Studies of Antibody-Mediated Clearance of Tau Aggregates Using an ex vivo Brain Slice Model. In: *Front Psychiatry* 2, S. 59. DOI: 10.3389/fpsyt.2011.00059.
- Kumar-Singh, Samir; Theuns, Jessie; van Broeck, Bianca; Pirici, Daniel; Vennekens, Krist'I; Corsmit, Ellen et al. (2006): Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. In: *Hum. Mutat.* 27 (7), S. 686–695. DOI: 10.1002/humu.20336.
- Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M. et al. (1998): Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11), S. 6448–6453.
- Lee, V. M.; Balin, B. J.; Otvos, L., JR; Trojanowski, J. Q. (1991): A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. In: *Science* 251 (4994), S. 675–678.
- Lemere, Cynthia A. (2013): Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. In: *Mol Neurodegener* 8, S. 36. DOI: 10.1186/1750-1326-8-36.
- Levy-Lahad, E.; Wasco, W.; Poorkaj, P.; Romano, D. M.; Oshima, J.; Pettingell, W. H. et al. (1995): Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. In: *Science* 269 (5226), S. 973–977.
- Lewis, J.; McGowan, E.; Rockwood, J.; Melrose, H.; Nacharaju, P.; van Slegtenhorst, M. et al. (2000): Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice

- expressing mutant (P301L) tau protein. In: *Nat Genet* 25 (4), S. 402–405. DOI: 10.1038/78078.
- Lyketsos, C. G.; Breitner, J C S; Green, R. C.; Martin, B. K.; Meinert, C.; Piantadosi, S.; Sabbagh, M. (2007): Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. In: *Neurology* 68 (21), S. 1800–1808. DOI: 10.1212/01.wnl.0000260269.93245.d2.
- Maeda, Sumihiro; Sahara, Naruhiko; Saito, Yuko; Murayama, Miyuki; Yoshiike, Yuji; Kim, Hyonchol et al. (2007): Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. In: *Biochemistry* 46 (12), S. 3856–3861. DOI: 10.1021/bi061359o.
- Maeda, Sumihiro; Sahara, Naruhiko; Saito, Yuko; Murayama, Shigeo; Ikai, Atsushi; Takashima, Akihiko (2006): Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. In: *Neurosci. Res.* 54 (3), S. 197–201. DOI: 10.1016/j.neures.2005.11.009.
- Mallery, Donna L.; McEwan, William A.; Bidgood, Susanna R.; Towers, Greg J.; Johnson, Chris M.; James, Leo C. (2010): Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (46), S. 19985–19990. DOI: 10.1073/pnas.1014074107.
- Masliah, E.; Hansen, L.; Adame, A.; Crews, L.; Bard, F.; Lee, C. et al. (2005): Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. In: *Neurology* 64 (1), S. 129–131. DOI: 10.1212/01.WNL.0000148590.39911.DF.
- Masuhr, Karl F.; Neumann, Marianne (2007): *Neurologie*. 128 Tabellen. 6. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme (Duale Reihe).
- Mattson, M. P.; Chan, S. L.; Camandola, S. (2001): Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. In: *Bioessays* 23 (8), S. 733–744. DOI: 10.1002/bies.1103.
- McEwan, William A.; Tam, Jerry C H; Watkinson, Ruth E.; Bidgood, Susanna R.; Mallery, Donna L.; James, Leo C. (2013): Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. In: *Nat Immunol* 14 (4), S. 327–336. DOI: 10.1038/ni.2548.

- McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E. M. (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. In: *Neurology* 34 (7), S. 939–944.
- Meroni, Germana; Diez-Roux, Graciana (2005): TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. In: *Bioessays* 27 (11), S. 1147–1157. DOI: 10.1002/bies.20304.
- Mitchell, D. (2014): What? | JPND. Hg. v. JPND research. Online verfügbar unter <http://www.neurodegenerationresearch.eu/about/what/>, zuletzt geprüft am 05.10.2014.
- Muhs, Andreas; Hickman, David T.; Pihlgren, Maria; Chuard, Nathalie; Giriens, Valerie; Meerschman, Carine et al. (2007): Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (23), S. 9810–9815. DOI: 10.1073/pnas.0703137104.
- National Human Genome Research Institute (2014): Making a Mightier Knockout Mouse. Bethesda, Maryland, USA. Online verfügbar unter <http://www.genome.gov/27532436>, zuletzt geprüft am 05.10.2014.
- Nelson, Thomas J.; Alkon, Daniel L. (2005): Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. In: *J. Biol. Chem.* 280 (8), S. 7377–7387. DOI: 10.1074/jbc.M409071200.
- Nerenberg, S. T.; Prasad, R. (1975): Radioimmunoassays for Ig classes G, A, M, D, and E in spinal fluids: normal values of different age groups. In: *J Lab Clin Med* 86 (5), S. 887–898.
- Neve, Rachael L.; Harris, Peter; Kosik, Kenneth S.; Kurnit, David M.; Donlon, Timothy A. (1986): Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. In: *Molecular Brain Research* 1 (3), S. 271–280. DOI: 10.1016/0169-328X(86)90033-1.
- Nicoll, James A R; Barton, Edward; Boche, Delphine; Neal, Jim W.; Ferrer, Isidro; Thompson, Petrina et al. (2006): Abeta species removal after abeta42 immunization. In: *J*

Neuropathol Exp Neurol 65 (11), S. 1040–1048. DOI: 10.1097/01.jnen.0000240466.10758.ce.

Nicoll, James A R; Wilkinson, David; Holmes, Clive; Steart, Phil; Markham, Hannah; Weller, Roy O. (2003): Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. In: *Nat. Med.* 9 (4), S. 448–452. DOI: 10.1038/nm840.

Nixon, Ralph A.; Cataldo, Anne M. (2006): Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease. In: *J Alzheimers Dis* 9 (3 Suppl), S. 277–289.

Nowakowska, Beata A.; Obersztyn, Ewa; Szymańska, Krystyna; Bekiesińska-Figatowska, Monika; Xia, Zhilian; Ricks, Christian B. et al. (2010): Severe mental retardation, seizures, and hypotonia due to deletions of MEF2C. In: *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B (5), S. 1042–1051. DOI: 10.1002/ajmg.b.31071.

Orgogozo, J-M; Gilman, S.; Dartigues, J-F; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C. et al. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. In: *Neurology* 61 (1), S. 46–54.

Pappolla, Miguel A.; Smith, Mark A.; Bryant-Thomas, Tara; Bazan, Nicolas; Petanceska, Suzana; Perry, George et al. (2002): Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis¹ ¹This article is part of a series of reviews on "Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. In: *Free Radical Biology and Medicine* 33 (2), S. 173–181. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00841-9.

Paquet (2012): Alzheimer im Aquarium – Wie Zebrafische bei der Demenz für Durchblick sorgen. Hg. v. Elitenetzwerk bayern. München. Online verfügbar unter <https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerk-home/forschungsarbeiten/lebenswissenschaften/2012/paquet-alzheimer000/>, zuletzt geprüft am 06.10.2014.

Pastor, Pau; Roe, Catherine M.; Villegas, Andres; Bedoya, Gabriel; Chakraverty, Sumi; Garcia, Gloria et al. (2003): Apolipoprotein Eepsilon4 modifies Alzheimer's disease onset in an E280A PS1 kindred. In: *Ann Neurol* 54 (2), S. 163–169. DOI: 10.1002/ana.10636.

- Pei, J. J.; Braak, E.; Braak, H.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Winblad, B.; Cowburn, R. F. (1999): Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 58 (9), S. 1010–1019.
- Pfeffer, Suzanne R. (2001): Membrane transport: Retromer to the rescue. In: *Current Biology* 11 (3), S. R109. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00042-2.
- Pride, Michael; Seubert, Peter; Grundman, Michael; Hagen, Michael; Eldridge, John; Black, Ronald S. (2008): Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. In: *Neurodegener Dis* 5 (3-4), S. 194–196. DOI: 10.1159/000113700.
- Rajsbaum, Ricardo; Garcia-Sastre, Adolfo; Versteeg, Gijs A. (2014): TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. In: *J Mol Biol* 426 (6), S. 1265–1284. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.12.005.
- Rassow, Joachim (2006): Biochemie. 50 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Roberson, Erik D.; Searce-Levie, Kimberly; Palop, Jorge J.; Yan, Fengrong; Cheng, Irene H.; Wu, Tiffany et al. (2007): Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. In: *Science* 316 (5825), S. 750–754. DOI: 10.1126/science.1141736.
- Rogaev, E. I.; Sherrington, R.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Liang, Y. et al. (1995): Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. In: *Nature* 376 (6543), S. 775–778. DOI: 10.1038/376775a0.
- Rogaeva, Ekaterina; Meng, Yan; Lee, Joseph H.; Gu, Yongjun; Kawarai, Toshitaka; Zou, Fanggeng et al. (2007): The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. In: *Nat. Genet.* 39 (2), S. 168–177. DOI: 10.1038/ng1943.
- Rosenmann, Hanna; Grigoriadis, Nikolaos; Karussis, Dimitrios; Boimel, Moran; Touloumi, Olga; Ovadia, Haim; Abramsky, Oded (2006): Tauopathy-like abnormalities and

- neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. In: *Arch Neurol* 63 (10), S. 1459–1467. DOI: 10.1001/archneur.63.10.1459.
- Ryan, J. Michael; Grundman, Michael (2009): Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: ACC-001 clinical trials are ongoing. In: *J. Alzheimers Dis.* 17 (2), S. 243. DOI: 10.3233/JAD-2009-1118.
- Saido, Takaomi C.; Iwatsubo, Takeshi; Mann, David M.A; Shimada, Hiroyuki; Ihara, Yasuo; Kawashima, Seiichi (1995): Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. In: *Neuron* 14 (2), S. 457–466. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90301-1.
- Salomone, Salvatore; Caraci, Filippo; Leggio, Gian Marco; Fedotova, Julia; Drago, Filippo (2012): New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. In: *Br J Clin Pharmacol* 73 (4), S. 504–517. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04134.x.
- Santacruz, K.; Lewis, J.; Spires, T.; Paulson, J.; Kotilinek, L.; Ingelsson, M. et al. (2005): Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. In: *Science* 309 (5733), S. 476–481. DOI: 10.1126/science.1113694.
- Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H. et al. (1993): Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. In: *Neurology* 43 (8), S. 1467–1472.
- Schenk, Dale (2002): Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. In: *Nat Rev Neurosci* 3 (10), S. 824–828. DOI: 10.1038/nrn938.
- Scherzer, Clemens R.; Offe, Katrin; Gearing, Marla; Rees, Howard D.; Fang, Guofu; Heilman, Craig J. et al. (2004): Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. In: *Arch. Neurol.* 61 (8), S. 1200–1205. DOI: 10.1001/archneur.61.8.1200.
- Schneeberger, A.; Mandler, M.; Ottawa, O.; Zauner, W.; Mattner, F.; Schmidt, W. (2009): Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)--from concept to clinical testing. In: *J Nutr Health Aging* 13 (3), S. 264–267.

- Schwartz, Michal; Shechter, Ravid (2010): Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. In: *Nat Rev Neurol* 6 (7), S. 405–410. DOI: 10.1038/nrneurol.2010.71.
- Sigurdsson, Einar M. (2009): Tau-focused immunotherapy for Alzheimer's disease and related tauopathies. In: *Curr Alzheimer Res* 6 (5), S. 446–450.
- Small, Scott A.; Duff, Karen (2008): Linking A β and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis. In: *Neuron* 60 (4), S. 534–542. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.11.007.
- Small, Scott A.; Gandy, Sam (2006): Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. In: *Neuron* 52 (1), S. 15–31. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.09.001.
- Strittmatter, W. J.; Roses, A. D. (1996): Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. In: *Annu Rev Neurosci* 19, S. 53–77. DOI: 10.1146/annurev.ne.19.030196.000413.
- Summers, William K. (2004): Alzheimer's disease, oxidative injury, and cytokines. In: *J Alzheimers Dis* 6 (6), S. 651–7; discussion 673–81.
- Szekely, C. A.; Green, R. C.; Breitner, J C S; Ostbye, T.; Beiser, A. S.; Corrada, M. M. et al. (2008): No advantage of A beta 42-lowering NSAIDs for prevention of Alzheimer dementia in six pooled cohort studies. In: *Neurology* 70 (24), S. 2291–2298. DOI: 10.1212/01.wnl.0000313933.17796.f6.
- Szigeti, Kinga; Doody, Rachelle S. (2011): Should EOAD patients be included in clinical trials? In: *Alzheimers Res Ther* 3 (1), S. 4. DOI: 10.1186/alzrt63.
- Tabaton, Massimo; Zhu, Xiongwei; Perry, George; Smith, Mark A.; Giliberto, Luca (2010): Signaling effect of amyloid- β 42 on the processing of A β PP. In: *Experimental Neurology* 221 (1), S. 18–25. DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.09.002.
- Takashima, A.; Murayama, M.; Murayama, O.; Kohno, T.; Honda, T.; Yasutake, K. et al. (1998): Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (16), S. 9637–9641.

- Tanzi, Rudolph E.; Bertram, Lars (2005): Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. In: *Cell* 120 (4), S. 545–555. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.008.
- The Jackson laboratory (2014): JAX Mice Database - 004779 STOCK Mapt/J . Hg. v. The Jackson laboratory. Maine, USA. Online verfügbar unter <http://jaxmice.jax.org/strain/004779.html>, zuletzt aktualisiert am 17.10.2014, zuletzt geprüft am 17.10.2014.
- Tiraboschi, P.; Hansen, L. A.; Masliah, E.; Alford, M.; Thal, L. J.; Corey-Bloom, J. (2004): Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. In: *Neurology* 62 (11), S. 1977–1983.
- Townsend, Matthew; Mehta, Tapan; Selkoe, Dennis J. (2007): Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. In: *J. Biol. Chem.* 282 (46), S. 33305–33312. DOI: 10.1074/jbc.M610390200.
- Trempe, Jean-Francois (2011): Reading the ubiquitin postal code. In: *Curr Opin Struct Biol* 21 (6), S. 792–801. DOI: 10.1016/j.sbi.2011.09.009.
- Trinczek, B.; Biernat, J.; Baumann, K.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. (1995): Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. In: *Mol Biol Cell* 6 (12), S. 1887–1902.
- Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1995 Dec): Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. In: *Mol Biol Cell* 6 (12), S. 1887–1902, zuletzt geprüft am 05.10.2014.
- Tucker, K. L.; Meyer, M.; Barde, Y. A. (2001): Neurotrophins are required for nerve growth during development. In: *Nat Neurosci* 4 (1), S. 29–37. DOI: 10.1038/82868.
- Vassar, R. (1999): Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. In: *Science* 286 (5440), S. 735–741. DOI: 10.1126/science.286.5440.735.
- Wang, Jian-Zhi; Liu, Fei (2008): Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. In: *Prog. Neurobiol.* 85 (2), S. 148–175. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.03.002.

- Wang, Xingbin; Lopez, Oscar L.; Sweet, Robert A.; Becker, James T.; DeKosky, Steven T.; Barmada, Mahmud M. et al. (2014): Genetic Determinants of Disease Progression in Alzheimer's Disease. In: *J Alzheimers Dis*. DOI: 10.3233/JAD-140729.
- Wild-Bode, C.; Yamazaki, T.; Capell, A.; Leimer, U.; Steiner, H.; Ihara, Y.; Haass, C. (1997): Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. In: *J Biol Chem* 272 (26), S. 16085–16088.
- Winblad, Bengt; Andreasen, Niels; Minthon, Lennart; Floesser, Annette; Imbert, Georges; Dumortier, Thomas et al. (2012): Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. In: *The Lancet Neurology* 11 (7), S. 597–604. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70140-0.
- Wisniewski, K. E.; Dalton, A. J.; McLachlan, C.; Wen, G. Y.; Wisniewski, H. M. (1985): Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. In: *Neurology* 35 (7), S. 957–961.
- Wisniewski, Thomas (2012): Active immunotherapy for Alzheimer's disease. In: *The Lancet Neurology* 11 (7), S. 571–572. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70136-9.
- Wisniewski, Thomas; Frangione, Blas (1992): Apolipoprotein E: A pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. In: *Neuroscience Letters* 135 (2), S. 235–238. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90444-C.
- Wisniewski, Thomas; Frangione, Blas (2005): Immunological and anti-chaperone therapeutic approaches for Alzheimer disease. In: *Brain Pathol* 15 (1), S. 72–77.
- Wisniewski, Thomas; Goñi, Fernando (2014): Immunotherapy for Alzheimer's disease. In: *Biochem. Pharmacol.* 88 (4), S. 499–507. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.020.
- Witman, G. B.; Cleveland, D. W.; Weingarten, M. D.; Kirschner, M. W. (1976): Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (11), S. 4070–4074.
- Wolfe, M. S.; Xia, W.; Ostaszewski, B. L.; Diehl, T. S.; Kimberly, W. T.; Selkoe, D. J. (1999): Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. In: *Nature* 398 (6727), S. 513–517. DOI: 10.1038/19077.

- Yanamandra, Kiran; Kfoury, Najla; Jiang, Hong; Mahan, Thomas E.; Ma, Shengmei; Maloney, Susan E. et al. (2013): Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. In: *Neuron* 80 (2), S. 402–414. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.046.
- Zhu, X. (2004): Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. In: *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 19 (6), S. 345–352. DOI: 10.1177/153331750401900611.
- Zlokovic, B. (1997): Can blood-brain barrier play a role in the development of cerebral amyloidosis and Alzheimer's disease pathology. In: *Neurobiol Dis* 4 (1), S. 23–26. DOI: 10.1006/nbdi.1997.0134.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

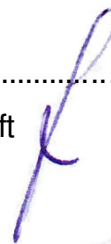
23.06.2015

.....

Datum

.....

Unterschrift



9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: **Marie-Catherine Schaller**
Adresse: Josephinenstr. 27, 04317 Leipzig
Geburtstag/-ort: 9. Januar 1987, Naumburg
E-Mail: macascha@yahoo.de
Staatsangehörigkeit: Deutschland

Ausbildung

6/2006 **Abitur** am Karl-Theodor-Liebe Gymnasium, Gera
10/2007 bis 7/2014 **Medizinstudium** an der Universität Leipzig
09/2009 **1. Staatsexamen**
07/2014 **2. Staatsexamen**

Praktika

02/2013 - 01/2014 **Praktisches Jahr**
1. Terial: Kardiologie in Montpellier, Frankreich
2. Terial, erste Hälfte: Kinderchir. am Uniklinikum Leipzig
zweite Hälfte: Allgemeinchirurgie in Guadalajara, Mexiko
3. Terial: Pädiatrie am Universitätsklinikum Leipzig
10/2009 - 10/2012 **Famulaturen**
Radiologie, Traumatologie, Neurochirurgie und
Kinderchirurgie jeweils am Universitätsklinikum Leipzig
02/2012 - 03/2012 **Tropenmedizinischer Lehrgang**
10/2011 - 10/2012 **Praxisbezogener systematischer EKG-Kurs**
09/2006 - 10/2007 **Freiwilliges Soziales Jahr** im SHR Waldklinikum Gera
08/2003 - 07/2004 **Austauschjahr** an der Capital High School in Boise, USA

Berufstätigkeit

06-08/2015 **Facharztweiterbildung in in der kinderchirurgischen Praxis** von Dr. med. Gerald Woitek in Leipzig
Seit 09/2015 **Facharztweiterbildung in der Abteilung für Kinderchirurgie** des Universitätsklinikums Leipzig

Kenntnisse und Fähigkeiten

Englisch	verhandlungssicher
Französisch	gut
Spanisch	gut

Leipzig, 9. Oktober 2015

Marie-Catherine Schaller

10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit hilfreich unterstützt haben:

Dieser Dank gilt besonders meinem Betreuer Dr. Max Holzer, der zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, mich ständig während meiner Arbeit unterstützte und mir immer beratend zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich Carsten Jäger, Dr. Markus Morawski, Dr. Thorsten Bullmann, Isabel Hilbrich und Anne Suttikus für die Unterstützung in praktischen Angelegenheiten im Labor, sowie für die Präparation des Rückenmarks danken.

Besonders möchte ich Dr. Gudrun Seeger danken, die eine zweite unabhängige Quantifizierung der Motoneurone in den Rückenmarksquerschnitten unternahm.